

---

Aus dem Bereich

Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

# **Rapamycin beeinträchtigt die frühe Frakturheilung in der Maus**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2008

vorgelegt von: Moritz Klein

geb. am: 20.08.1981 in Zweibrücken

---

Aus der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie,  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar  
Direktor: Prof. Dr. med. T. Pohlemann

---

---

**Dekan: Prof. Dr. med. Menger**

**1.Gutachter:**

**2.Gutachter:**

**Jahr der Promotion: 2009**

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	1
1 Zusammenfassung.....	5
1.1 Zusammenfassung.....	5
1.2 Summary .....	7
2 Einleitung .....	10
2.1 Knochen .....	10
2.1.1 Morphologie .....	10
2.1.2 Histologie .....	10
2.1.3 Physiologie .....	14
2.2 Frakturheilung .....	15
2.2.1 Primäre Frakturheilung .....	15
2.2.2 Sekundäre Frakturheilung .....	16
2.3 Vascular endothelial growth factor (VEGF) .....	18
2.4 Frakturmodelle .....	21
2.4.1 Maus .....	22
2.4.2 Ratte .....	24
2.4.3 Kaninchen.....	24
2.4.4 Katze.....	25
2.4.5 Hund .....	25
2.4.6 Schaf.....	26
2.4.7 Ziege.....	26
2.4.8 Pferd .....	27
2.4.9 Primat .....	27
2.5 Rapamycin.....	27
2.5.1 Historie .....	27
2.5.2 Struktur.....	28
2.5.3 Wirkmechanismus .....	29
2.5.4 Pharmakokinetik.....	29
2.5.5 Indikationen und Anwendung .....	30
2.5.6 Nebenwirkungen .....	31
2.6 Zielsetzung .....	32
2.7 Fragestellung .....	32

3	Material und Methoden .....	33
3.1	Intervention .....	33
3.1.1	Versuchsprotokoll .....	33
3.1.2	Tiermodell .....	34
3.1.3	Operation.....	35
3.1.4	Medikamentenapplikation .....	44
3.1.5	Tötung der Tiere.....	44
3.1.6	Präparation der Knochen.....	45
3.2	Zielkriterien und Auswertung .....	45
3.2.1	Radiologie .....	45
3.2.2	Biomechanik.....	46
3.2.3	Histomorphometrie.....	48
3.2.4	Western Blot.....	50
3.3	Statistik.....	55
4	Ergebnisse .....	56
4.1	Postoperativer Verlauf.....	56
4.2	Makroskopie.....	57
4.3	Radiologie .....	57
4.4	Biomechanik.....	61
4.5	Histologie .....	63
4.6	Western Blot.....	68
5	Diskussion .....	70
5.1	Diskussion der Methoden.....	70
5.2	Diskussion der Ergebnisse .....	75
5.3	Schlussfolgerungen .....	81
6	Literaturverzeichnis.....	83
7	Publikationen / Danksagung.....	98
7.1	Publikationen.....	98
7.2	Danksagung.....	99
8	Lebenslauf.....	100

## Abkürzungsverzeichnis

Ø	Durchmesser
°	Grad
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
%	Prozent
2-D	zweidimensional
3-D	dreidimensional
A. dest.	Aqua destillata
Abb.	Abbildung
ANOVA	analysis of variance
AO	Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthese
APS	Ammoniumpersulfat
ASBMR	American Society of Bone and Mineral Research
ASIF	Association for the Study of Internal Fixation
ATG	Anti-Thymozyten-Globulin
AZ	Aktenzeichen
B	Bindegewebe
B.Cl.Ar	Knöcherne Kallusfläche (bone callus area)
B.Dm	Femurdurchmesser (bone diameter)
Bis	Bis-Acrylamid
BMP	Bone morphogenetic protein
BrdU	Bromodeoxyuridin
BRU	bone remodeling unit
BSA	bovine serum albumin
Bsp	bone sialoprotein
Cg.Cl.Ar	Knorpelige Kallusfläche (cartilage callus area)
Cl.Ar	Kallusfläche (callus area)
cm	Zentimeter
CNI	Calcineurininhibitor
CT	Computertomographie
Cu	Kupfer

## Abkürzungsverzeichnis

---

CYP	Cytochrome P
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
et al.	et alteri
Fb.Cl.Ar	Bindegewebige Kallusfläche (fibrous callus area)
FGF	fibroblast growth factor
FIGF	c-fos-induced growth factor
FK506	Tacrolimus
FKBP	FK-bindendes Protein
Flk	fetal liver kinase
Flt	fms like tyrosine kinase
g	Gramm
GK	Geflechtknochen
HAT	Leberarterienthrombose (hepatic arterial thrombosis)
HRP	horseradish peroxidase
HUVEC	human umbilical cord vein cells
i.d.R.	in der Regel
Ig	Immunglobulin
K	Kalium
K	Knochen
kg	Kilogramm
KK	Kortikaler Knochen
Kn	Knorpel
LDH	Laktatdehydrogenase
M	Mittelwert
M	Mol
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
mM	Millimol
mol	Mol

## Abkürzungsverzeichnis

---

MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	mammalian target of rapamycin
mV	Millivolt
N	Natrium
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumkarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Nmm	Newtonmillimeter
Ocn	Osteocalcin
OD	Optische Dichte
Osx	Osterix
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PDGF	platelet derived growth factor
PDS	Polydioxanon
PET	Positronenemissionstomographie
PlGF	placental growth factor
PMSF	Phenylmethysulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidifluorid
RAPA	Rapamycin
Runx	Runt related transcription factor
s	Sekunde
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SD	Standardabweichung
SDS	sodium dodecylsulfate
Tab.	Tabelle
TBS-T	Tris gepuffertes salziges Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF-β	transforming growth factor beta
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
U	Umdrehungen
V	Volt
VEGF	vascular endothelial growth factor

## Abkürzungsverzeichnis

---

VEGFR	VEGF-Rezeptor
VPF	vascular permeability factor



# **1 Zusammenfassung**

## **1.1 Zusammenfassung**

Es konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass Rapamycin und andere Immunsuppressiva negativ in den Knochenstoffwechsel eingreifen. Aufgrund einer steigenden Anzahl an Patienten, die nach Organtransplantationen eine immunsuppressive Therapie mit Rapamycin erhalten, wird auch die Häufigkeit an Frakturen unter Rapamycin-Behandlung steigen. Vor diesem Hintergrund wurde die hier vorgestellte Studie konzipiert, um erstmals den Einfluss von Rapamycin auf die Knochenbruchheilung zu untersuchen.

Die durchgeführten tierexperimentellen Untersuchungen sollten die Frage beantworten, inwieweit ein Unterschied in der Frakturheilung zwischen Rapamycin-behandelten und unbehandelten Mäusen besteht. Bislang war dabei völlig unbekannt, ob Rapamycin die Frakturheilung hemmt, unbeeinflusst lässt oder gar fördert.

Als Versuchstiere dienten ausgewachsene haarlose Mäuse (SKH1-hr), da für diese Spezies bereits ein geeignetes und standardisiertes Frakturmodell existierte. Nach geschlossener Femurfrakturierung und –stabilisierung wurde den Versuchstieren (n = 69) täglich Rapamycin (n = 35) bzw. als Kontrolle die entsprechende Trägersubstanz (n = 34) intraperitoneal appliziert. Nach zweiwöchiger bzw. fünfwöchiger Frakturheilung wurden die Versuchstiere durch eine Überdosis Phenobarbital getötet, um die Knochen für die weitere radiologische, biomechanische, histomorphometrische und proteinbiochemische Auswertung zu reseziieren und zu präparieren.

Die radiologische Auswertung diente der quantitativen Analyse des Kallusdurchmessers sowie der Fläche des periostalen Frakturkallus. Als Zielparameter wurden der Kallusdurchmesser in Relation zum Femurdurchmesser in Höhe des Frakturspaltens sowie die periostale Kallusfläche in Relation zur Femurfläche bestimmt.

Die biomechanische Rotationstestung diente der Evaluierung der Stabilität des Frakturkallus. Als Zielparameter wurden der maximale Torsionswinkel und das maximale Drehmoment bei Versagen des Knochens sowie die Torsionssteifigkeit der Knochen bestimmt und in Relation zu den jeweiligen Werten der unfrakturierten kontralateralen Femora quantifiziert.

Die Histomorphometrie diente der quantitativen Analyse der Fläche sowie der Gewebezusammensetzung des Frakturkallus. Hierzu wurden im Bereich des maximalen Kallusdurchmessers sagittale longitudinale Schnittpräparate angefertigt und nach der Masson-Goldner-Methode gefärbt. Als Zielparameter wurden die Kallusfläche in Relation zum Femurdurchmesser sowie der relative Anteil an Knochen, Knorpel und Bindegewebe am Gesamtkallus quantifiziert.

Die Western-Blot-Analyse diente dem semiquantitativen Nachweis des Proliferationsmarkers PCNA sowie des angiogenen und osteogenen Wachstumsfaktors VEGF im Frakturkallus.

Nach der Auswertung der radiologischen, biomechanischen, histomorphometrischen und proteinbiochemischen Analysen fanden sich folgende Ergebnisse:

- I. Die radiologischen, histomorphometrischen und biomechanischen Untersuchungen ergaben für alle Versuchstiere beider Versuchsgruppen nach fünf Wochen eine fortgeschrittene Knochenbruchheilung im Vergleich zu den ersten zwei Wochen nach Frakturierung. Dies zeigte sich radiologisch und histomorphometrisch in einer fortgeschrittenen Verknöcherung sowie biomechanisch in einer höheren Torsionssteifigkeit des Frakturkallus.
- II. In den radiologischen Untersuchungen zeigten sich nach zweiwöchiger Frakturheilung der Kallusdurchmesser sowie die Fläche des periostalen Frakturkallus unter Rapamycin-Behandlung im Vergleich zu den Kontroll-Tieren signifikant vermindert. Nach fünf Wochen hingegen glichen sich die Ergebnisse zwischen den beiden Versuchsgruppen an, so dass zu diesem Zeitpunkt keine signifikanten Unterschiede mehr nachgewiesen werden konnten.
- III. In den biomechanischen Untersuchungen konnte nach zweiwöchiger Frakturheilung eine signifikant geringere Torsionssteifigkeit des Frakturkallus unter Rapamycin-Behandlung gegenüber den Kontroll-Tieren aufgezeigt werden. Auch hier glichen sich die Ergebnisse nach fünf Wochen an.
- IV. Die histomorphometrischen Untersuchungen ergaben nach zweiwöchiger Frakturheilung unter Rapamycin-Behandlung im Vergleich zu den Kontroll-Tieren

eine signifikant verminderte Kallusfläche verbunden mit einem signifikant geringeren knöchernen Kallusanteil. Nach fünf Wochen waren korrelierend mit den radiologischen Untersuchungen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen nachweisbar.

- V. Die Western-Blot-Analyse zeigte nach zweiwöchiger Frakturheilung unter Rapamycin-Behandlung im Vergleich zu den Kontroll-Tieren eine Minderexpression sowohl von PCNA als auch von VEGF.
- VI. Die Ergebnisse der unterschiedlichen Untersuchungsmethoden korrelierten, so dass die gewählten Methoden als geeignet im Hinblick auf die Untersuchung der Fragestellung angesehen werden können.

Zusammenfassend konnte in der hier vorgestellten Studie erstmals eine massive Beeinträchtigung der frühen Knochenbruchheilung durch das Immunsuppressivum Rapamycin aufgezeigt werden. Diese ungünstige Wirkung von Rapamycin sollte bei der Behandlung von Patienten mit Knochenbrüchen beachtet werden.

## **1.2 Summary**

Numerous studies have shown that rapamycin and other immunosuppressants affect bone metabolism. Because a growing number of patients is treated by immunosuppressants after organ transplantation, there will be an increase in the number of fractures under rapamycin treatment. On this background the herein introduced study was conducted to analyze the effects of rapamycin on fracture healing.

The aim of the study was to evaluate, if there is a difference in the course of fracture healing between rapamycin-treated and vehicle-treated mice. So far, there is a complete lack of information on whether rapamycin is affecting bone repair.

We used adult hairless mice (SKH1-hr), because a standardized fracture model is already available for this species. After the production and stabilization of a closed femur fracture, mice (n = 69) were treated by a daily i.p. injection of rapamycin (n = 35) or the according vehicle (n = 34). After two and five weeks of fracture healing the animals were sacrificed

using phenobarbital to prepare the femora for radiological, biomechanical, histomorphometric and western blot analysis.

The radiological analysis was used to evaluate the callus diameter and the area of the periosteal callus in relation to the diameter of the femur.

The biomechanical analysis was conducted to evaluate the torsional stability of the fracture callus. The following biomechanical parameters of the fractured femora were calculated and given in percent of the corresponding unfractured contralateral femora: peak torque at failure, peak rotation angle at failure and torsional stiffness.

Histomorphometry was applied to analyze the area and the tissue composition of the callus. We stained longitudinal sections of the callus according to the trichrome method and calculated the total callus area in relation to femoral bone diameter at the fracture gap as well as the bone callus area, the cartilaginous callus area and the fibrous callus area in relation to total callus area.

To evaluate cell proliferation within the callus, western blot analysis of PCNA expression was performed after two weeks of fracture healing. In addition, the expression of the angiogenic and osteogenic growth factor VEGF was evaluated by western blot analysis.

The radiological, biomechanical, histomorphometric and western blot analyses revealed the following results:

- I. Radiological, biomechanical and histomorphometric analyses showed for all animals a progressive fracture healing after five weeks in relation to the first two weeks after fracture. This was indicated by a progressive ossification as well as by an increased torsional stiffness of the fracture callus.
- II. Two weeks after fracture the radiological analysis showed an almost complete lack of callus formation in the rapamycin-treated animals. However, the difference in callus formation between the two groups observed at two weeks had disappeared by five weeks.

- III. After two weeks of fracture healing the torsional stiffness of the fracture callus was significantly decreased under rapamycin treatment. At five weeks after fracture no significant differences could be detected between both study groups.
- IV. The results of the histomorphometric analysis showed a significantly decreased callus size in rapamycin-treated animals at two weeks when compared with vehicle-treated controls. In addition, bone formation in the callus was found reduced. After five weeks callus was composed mainly of bone without significant differences between rapamycin-treated animals and vehicle-treated controls.
- V. The western blot analysis revealed a reduced expression of both PCNA and VEGF at two weeks in rapamycin-treated animals when compared to vehicle-treated controls.
- VI. The results of the different analysis methods correlated, so that the chosen methods are supposed to be appropriate tools to study the effect of rapamycin on fracture healing.

In conclusion, we demonstrated that rapamycin leads to a severe alteration of early fracture healing. Considering the increasing administration of rapamycin in transplant and cancer patients, these detrimental effects of rapamycin should be kept in mind when treating patients with bone fractures.

## **2 Einleitung**

### **2.1 Knochen**

#### **2.1.1 Morphologie**

Knochen werden anhand ihrer Form unterschieden in:

- lange Knochen
- kurze Knochen
- platte Knochen

Für die vorliegende Arbeit wurden lange Knochen, die auch Röhrenknochen genannt werden, untersucht.

An Röhrenknochen werden drei Bereiche unterschieden:

- die längliche, schaftförmige Diaphyse
- die beiden Epiphysen an den Knochenenden
- die zwischen Diaphyse und Epiphysen gelegenen Metaphysen

In der vorliegenden Arbeit diente die Diaphyse als Frakturlokalisierung.

#### **2.1.2 Histologie**

Histologisch gliedert sich der Knochen in:

- eine äußere Substantia compacta (Kompakta), bestehend aus kortikalem Knochen
- eine innere Substantia spongiosa (Spongiosa), bestehend aus trabekulärem Knochen

Die dicht gebaute Kompakta (Kortikalis) setzt sich beim Menschen aus Osteonen bzw. dem Havers-System zusammen. Hierbei handelt es sich um eine etwa 250 µm x 1-5 cm große

funktionelle Einheit aus 2-3  $\mu\text{m}$  dicken Knochenlamellen (Havers-Lamellen oder Speziallamellen), die konzentrisch um den Zentralkanal (Havers-Kanal) geschichtet sind. Die im Zentralkanal laufenden Blutgefäße (Havers-Gefäße) sind über seitliche Verzweigungen, die so genannten Volkmann-Kanäle, miteinander verbunden. Neben Gefäßen enthält der Zentralkanal Bindegewebe und vegetative Nerven. Zwischen den Osteonen befinden sich die Schaltlamellen, Reststücke von alten, teilweise abgebauten Havers-Systemen. Die äußeren an das Periost angrenzenden Lamellen werden als äußere Generallamellen, die inneren an die Spongiosa angrenzenden Lamellen als innere Generallamellen bezeichnet (Junqueira et al., 2004).

Die Maus besitzt im Gegensatz zum Menschen eine recht primitive Knochenstruktur ohne Havers-System. Der Knochenumbau nach einer Knochenverletzung erfolgt über so genannte Resorptionshöhlen. Diese entstehen in der Nähe der Fraktur und füllen sich dann im Laufe der Frakturheilung mit Osteoblasten auf (Nunamaker, 1998).

Mit Ausnahme der knorpeligen Gelenkflächen wird die Kortikalis von Periost überzogen. Das Periost wird funktionell in zwei unterschiedliche Schichten unterteilt:

- Stratum fibrosum
- Stratum osteogenicum

Das Stratum fibrosum ist durch Kollagenfaserbündel (Sharpey-Fasern) mit der Kortikalis teils fest, teils locker verbunden. Am Ansatz der Sehnen und Bänder wird die Zugbelastung auf den Knochen verringert, indem die Kollagenfasern der Sehnen und Bänder in das Stratum fibrosum einstrahlen und somit die Zugkräfte auf eine größere Ansatzfläche verteilen (Schiebler & Schmidt, 2003).

Das auch als Kambiumschicht bezeichnete Stratum osteogenicum enthält kleine Gefäße und Kapillaren, die die Volkmann- und Havers-Gefäße der Kompakta versorgen und somit die Ernährung der Knochensubstanz ermöglichen. Außerdem führt sie sensible Nervenfasern, die die Schmerzempfindungen im Bereich des Periosts hervorrufen. Des Weiteren trägt das Stratum osteogenicum zur Neubildung von Knochensubstanz bei, so dass hier eine Differenzierung der Osteoblasten während des Knochenwachstums stattfindet. Die Osteoblastendifferenzierung nimmt nach Abschluss des physiologischen Knochenwachstums

ab, setzt allerdings erneut im Rahmen der Frakturheilung ein (periostale Knochenneubildung) (Schiebler & Schmidt, 2003).

Die Spongiosa ist aus einem komplexen System aus Knochenbälkchen und Knochenplatten aufgebaut und beherbergt in ihren Zwischenräumen das Knochenmark (Junqueira et al., 2004).

Das Knochenmark wird während der Embryogenese zunächst als so genanntes rotes blutbildendes Mark angelegt, in dem sich ab dem 5.-6. Fetalmonat die Hämatopoese etabliert. Während primär das Knochenmark aller Knochen an der Blutneubildung beteiligt ist, wird in den langen Knochen das rote Mark ab dem vollendeten ersten Lebensjahr zunehmend von gelbem Fettmark ersetzt. Somit beschränkt sich die Blutbildung im höheren Lebensalter weitestgehend auf die kurzen und platten Knochen. Im Bedarfsfall (chronische Hypoxie und Anämie) ist eine Umkehr dieser Entwicklung möglich (Boecker et al., 2004).

Histologisch besteht das Knochenmark aus hämatopoetischen Zellen, Stroma und Blutgefäßen. Das Stroma enthält zudem Retikulozyten, Lipozyten und Osteoblasten. Die von den Retikulozyten gebildete Matrix bindet hämatopoetische Wachstumsfaktoren und Interleukine und präsentiert sie in biologisch aktiver Form den hämatopoetischen Zellen (Boecker et al., 2004).

Man unterscheidet zwei verschiedene Arten von Knochengewebe:

- Geflecht- oder Faserknochen
- Lamellenknochen

Bei jeder Knochenneubildung entsteht zunächst Geflechtknochen, der sich im weiteren Verlauf zu Lamellenknochen umdifferenziert (Junqueira et al., 2004).

Im Vergleich zu Lamellenknochen weist Geflechtknochen, dessen Kollagenfaserbündel unregelmäßig in der Grundsubstanz verlaufen, einen größeren Zellreichtum, eine diffuse Verteilung der Osteozyten und weniger anorganische Bestandteile auf. Während Lamellenknochen entlang mechanischer Kraftlinien wächst, erfolgt das Wachstum des Geflechtknochens entlang der Kapillaren (Junqueira et al., 2004).



Lamellen beschreiben 3-7  $\mu\text{m}$  dicke Knochenschichten aus Osteozyten und parallel verlaufenden, schraubenförmig angeordneten Kollagenfasern. Dieses Bauprinzip dient der Modellierung von Zug- und Druckbelastungen auf den Knochen (Bucher & Wartenberg, 1997).

Zwischen zwei Lamellen liegen in den Knochenhöhlen (Lacunae osseae) die Osteozyten. Von den Lakunen ziehen radiär Knochenkanälchen (Caniculi ossei) mit eingeschlossenen Osteozytenfortsätzen zu benachbarten Osteonen und stellen so eine Verbindung zum Havers-Kanal her (Junqueira et al., 2004).

Neben den Osteozyten enthält der Knochen mesenchymale Vorläuferzellen, Osteoblasten und Osteoklasten. Die Vorläuferzellen, die an der inneren und äußeren Knochenoberfläche sowie in den Havers-Kanälen liegen, verwandeln sich bei entsprechender -hauptsächlich hormoneller- Stimulation in Osteoblasten (Junqueira et al., 2004). An der Oberfläche der Knochenbälkchen wird von den Osteoblasten neue Knochengrundsubstanz gebildet und im weiteren Verlauf mit Hilfe der alkalischen Phosphatase mineralisiert (beim Menschen in der Spongiosa nach etwa 25, in der Kortikalis nach etwa 35 Tagen).

Inaktive Osteoblasten liegen der Knochenoberfläche auf und werden in diesem Zusammenhang auch Belegzellen (lining cells) genannt. Die Osteoblasten wandeln sich in Osteozyten um, nachdem sie vollständig von neu produziertem Osteoid umschlossen wurden (Junqueira et al., 2004).

Osteoklasten entwickeln sich im Gegensatz zu den übrigen Knochenzellen, die mesenchymalen Ursprungs sind, aus hämatopoetischen Vorläuferzellen. Sie dienen in Form von mehrkernigen Riesenzellen dem Abbau mineralisierter Knochengrundsubstanz. Osteoklasten liegen in Vertiefungen an der Knochenoberfläche (Howship-Lakunen) oder in der Kortikalis, in der sie Gefäßkanäle für neue Osteonen formen. So baut ein Osteoklast dieselbe Menge an Knochen ab, die 100-150 Osteoblasten zeitgleich produzieren (Junqueira et al., 2004).

Die Interzellulärsubstanz (Knochengrundsubstanz) besteht zu 65 % aus anorganischen und zu 35 % aus organischen Komponenten. Die anorganische Knochengrundsubstanz setzt sich vor allem aus Knochenmineralien wie Calciumphosphaten und Calciumcarbonaten zusammen.

Die organische Matrix unterteilt sich zu ca. 90 % in Kollagen und zu 10 % in nicht-kollagene Proteine und Lipide (Junqueira et al., 2004).

### **2.1.3 Physiologie**

Die Hauptaufgaben des Knochens sind:

- Stützfunktion
- Strukturfunktion
- Mobilitätsfunktion
- Calciumhomöostase

Unabdingbare Voraussetzung für die Aufrechterhaltung dieser Funktionen sind sich ständig wiederholende Formations- und Resorptionsvorgänge, die durch die folgenden Abläufe gekennzeichnet sind:

- Wachstum
- Modeling
- Remodeling

Das Knochenwachstum findet an den Epiphysenfugen statt und führt vor allem zu einem Längenzuwachs sowie zu einer Zunahme der Knochenmasse an sich (Junqueira et al., 2004).

Die Fähigkeit des Knochens, auf spezifische mechanische Erfordernisse mit gezielten Formveränderungen zu reagieren, bezeichnet man als Modeling. Diese Fähigkeit ist besonders während der Wachstumsphase ausgeprägt und nimmt mit zunehmendem Alter stark ab (Fleisch, 1997).

Remodeling beschreibt dynamische Umbauprozesse im Knochen, die belastungsunabhängig sind und somit auch zu keiner Zunahme an Knochenvolumen führen. Ziel dieses Vorganges, der ein Leben lang abläuft, ist unter anderem die Reparatur von Mikrofrakturen. Unter Coupling versteht man das ständige Gleichgewicht von Knochenresorption und neuem Knochenanbau. Die dazugehörige morphologische Struktur wird als bone remodeling unit (BRU) bezeichnet (Fleisch, 1997).

## **2.2 Frakturheilung**

### **2.2.1 Primäre Frakturheilung**

Unter primärer Frakturheilung versteht man die Vereinigung von Frakturfragmenten unter Umgehung einer äußeren Kallusmanschette. In Abhängigkeit von der absoluten Frakturspaltweite (beim Menschen größer oder kleiner als 0,2 mm) unterscheidet man Kontaktheilung und Spaltheilung.

Im Rahmen der Kontaktheilung erfolgt die Knochenregeneration durch longitudinal einwachsende Osteone. Dabei „bohren“ Osteoklasten einen so genannten Resorptionskanal in die Kortikalis des gegenüberliegenden Fragmentes und ebnen somit den Weg für Osteoblasten, welche konsekutiv im Zuge der Wiederauffüllung des Resorptionskanals Lamellenknochen bilden. Auf diesem Wege werden die Knochenfragmente direkt miteinander vereinigt (Rueter et al., 2003).

Im Rahmen der Spaltheilung wird der Frakturspalt innerhalb von 3-4 Wochen zunächst mit Geflechtknochen aufgefüllt. Anschließend wird in einer zweiten Phase das neu gebildete Knochengeflecht zu Lamellenknochen, der parallel zur Schaftachse ausgerichtet ist, umgebaut (Rueter et al., 2003).

Vorraussetzung für eine primäre Frakturheilung ist eine ausreichende Vaskularität sowie eine mechanische Frakturstabilität. Das medulläre Gefäßsystem wird dabei innerhalb weniger Tage im Sinne einer Kapillaraussprossung wiederhergestellt. Dies wird im Allgemeinen nur nach einer anatomischen Frakturreposition und Stabilisierung mittels Osteosynthese erreicht (Rueter et al., 2003).

Ob unter oben genannten Voraussetzungen an der Maus ebenfalls eine primäre Knochenbruchheilung möglich ist, ist bislang nicht bekannt. Bis dato angewandte Frakturmodelle an der Maus führen zu einer sekundären Frakturheilung (Hiltunen et al., 1993b; Manigrasso & O'Connor, 2004).

### **2.2.2 Sekundäre Frakturheilung**

Die Mehrzahl der Frakturen heilt durch eine sekundäre Frakturheilung aus. Diese Art der Frakturheilung erfolgt immer dann, wenn keine anatomische Reposition der Knochenfragmente erreicht wird. Die sekundäre Knochenbruchheilung lässt sich in fünf, sich teilweise überlappende, Phasen gliedern:

- Frakturphase
- Entzündungsphase
- Granulationsphase
- Phase der Kallushärtung
- Phase des Modeling und Remodeling

Die Frakturphase erstreckt sich vom Einsetzen einer Gewalteinwirkung auf den Knochen und das ihn umgebende Weichteilgewebe bis zu dem Augenblick, in dem die gesamte Kraft durch den brechenden Knochen und das umliegende Gewebe aufgehoben wird. Dieser Vorgang verletzt Kortikalis, Spongiosa, Knochenmark, Periost und in unterschiedlichem Ausmaß angrenzende Weichteile und führt so zu einem Hämatom im Frakturbereich (Rueter et al., 2003).

Unmittelbar im Anschluss an die Frakturphase setzt eine überschießende Kapillaraussprossung sowie eine Kaskade der Proliferation, Migration und Differenzierung von überwiegend pluripotenten Stammzellen, polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Mastzellen ein. Die Rolle der Mastzellen ist bisher nicht eindeutig geklärt, es wird aber vermutet, dass sie über die Ausschüttung von Heparin und heparinähnlichen Substanzen die lokale Vaskularisation und Zellmigration beeinflussen. Verschiedene Studien propagieren zudem, dass die aus dem hämatopoetischen System stammenden Mastzellen als Vorläuferzellen der Osteoklasten angesehen werden können (Boyle et al., 2003; Rueter et al., 2003; Teitelbaum & Ross, 2003).

In dieser frühen Phase der Frakturheilung scheint die Angiogenese eine wichtige Rolle für die Zellmigration und Zellnutrition zu spielen. Zudem wird diskutiert, dass mesenchymale Vorläuferzellen direkt dem einsproßenden Gefäßendothel entstammen (Tremain et al., 2001). Die gesteigerte Gewebsperfusion während der Entzündungsphase erfolgt unter einer so

genannten „Flussumkehr“. Unter physiologischen Bedingungen wird die Kortikalis zentrifugal, das heißt zu etwa zwei Drittel über die Markraumgefäße ernährt. Nach Frakturierung wird die Kortikalis dagegen hauptsächlich über die periostalen Gefäße perfundiert. Beim Menschen erreicht die Durchblutung in der zweiten Woche nach dem Trauma ein Maximum mit Werten um das Sechsfache der Norm (Rueter et al., 2003).

Zwischen der Kambiumschicht des Periosts (s.o.) und der Knochenoberfläche liegen so genannte Spindelzellen. Morphologisch sind Spindelzellen von Fibroblasten nicht zu unterscheiden. Da aus Spindelzellen allerdings Osteoblasten hervorgehen können, werden sie auch Osteoprogenitorzellen genannt (Rueter et al., 2003).

Nach 2-3 Tagen ist die Entzündungsphase abgeklungen. Das Hämatom, in dem sich bereits ein lichtet Netz von Fibrin und Kollagenfibrillen nachweisen lässt, wird rasch durch Granulationsgewebe bestehend aus Lymphozyten, Fibroblasten, neu gebildetem Kollagen und zahlreichen Kapillaren ersetzt. In unmittelbarer Nachbarschaft zu Fibroblasten finden sich innerhalb von Kollagenfibrillen bereits in diesem frühen Stadium der Frakturheilung Mineraldepots. Der so genannte weiche Kallus wird durch erste Granulationsgewebsbrücken zwischen den Knochenfragmenten gebildet. In dieser Phase beginnt auch der Abbau der abgestorbenen Fragmentenden durch Osteoklasten. Aus mesenchymalen Vorläuferzellen differenzieren Chondroblasten, während subperiostal eine direkte Knochenneubildung durch Osteoblasten einsetzt (desmale Ossifikation oder „primäre Kallusreaktion“) (Rueter et al., 2003).

Zur gleichen Zeit wandert ein so genanntes Blastem aus dem Markraum in das Frakturhämatom ein und füllt den Frakturspalt als medullärer Kallus. Beim Menschen sind nach etwa 3-4 Wochen die Fragmente durch Bindegewebe und Knorpel weich miteinander verbunden (Rueter et al., 2003). An der Maus ist dieses Stadium der Frakturheilung bereits nach 10-14 Tagen zu beobachten (Manigrasso & O'Connor, 2004).

Durch die zunehmende Mineralisation der Grundsubstanz „härtet der Kallus aus“. Die Mitochondrien hypertrophierter Chondrozyten liefern das hierfür notwendige Calcium. Im Gegensatz zu reifem Lamellenknochen verläuft der entstehende Geflechtknochen (enchondrale Ossifikation) nicht entlang mechanischer Belastungslinien, sondern entlang neuer Kapillarsprosse (s.o.). Zeitgleich erfolgt frakturspaltfern eine periostale

Osteoblastenproliferation und somit eine Ablagerung von Geflechtknochen zwischen der Diaphysenoberfläche und dem Periost (Rueter et al., 2003).

Auch während der Frakturheilung ist für den Abbau des nekrotischen Knochens sowie für den Umbau des mineralisierten Knorpels in Knochen die so genannte BRU verantwortlich (s.o.). Zusammengefasst wird calcifizierter Knorpel durch Osteoklasten resorbiert und durch osteoblastär gebildeten Geflechtknochen ersetzt (Rueter et al., 2003).

Der im Rahmen der Kallusbildung entstandene Geflechtknochen wird entsprechend seiner mechanischen Belastung in lamellären Knochen umgewandelt (Modeling). Den Abschluss der Knochenbruchheilung stellt die Wiederherstellung der normalen Knochenkontur sowie des ursprünglichen Markraums dar (Remodeling) (Rueter et al., 2003).

## **2.3 Vascular endothelial growth factor (VEGF)**

Das Einsprießen neuer Blutgefäße ist für die Weiterdifferenzierung mesenchymaler Zellen zu Chondrozyten während der sekundären Frakturheilung (enchondrale Ossifikation) von großer Bedeutung (Caplan, 1990). Als Schlüsselmolekül für die Angiogenese im Rahmen der sekundären Frakturheilung konnte der so genannte vascular endothelial growth factor (VEGF) identifiziert werden (Brighton & Hunt, 1997; Ferguson et al., 1999). Überdies hinaus scheint VEGF auch die Formierung und Mineralisierung neuen Knochens direkt zu beeinflussen (Geiger et al., 2005).

VEGF wurde erstmals 1983 von Senger et. al. isoliert und als vascular permeability factor (VPF) publiziert (Senger et al., 1983). In den Folgejahren wurde VEGF als einer der wichtigsten Überlebens- und Wachstumsfaktoren des Gefäßendothels durch verschiedene Arbeitsgruppen charakterisiert (Ferrara & Henzel, 1989; Gospodarowicz et al., 1989; Tischer et al., 1989). Bis heute konnten zahlreiche Untertypen des VEGF, wie etwa VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, FIGF (c-fos-induced growth factor) oder PlGF (placental growth factor) 1, 2 und 3 identifiziert werden (Plate & Warnke, 1997). Ihre genaue Funktion wurde in diversen Studien untersucht (Joukov et al., 1997; Jussila & Alitalo, 2002; Schoppmann et al., 2002). Grundsätzlich besitzen aber alle Mitglieder der VEGF-Familie die Fähigkeit, Endothelzellen zu stimulieren (Nicosia, 1998).

Beim Menschen entstehen durch alternatives Splicen des VEGF-Genes fünf verschiedene Isoformen (Ferrara & Keyt, 1997; Houck et al., 1991). Sie werden nach der Länge ihrer Aminosäureketten charakterisiert (VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF189 und VEGF206) und haben folglich auch unterschiedliche Eigenschaften. Die kürzeren Formen VEGF121, VEGF145 und VEGF165 sind weitgehend frei diffundierend und weisen ein sehr hohes angiogenes Potential auf. Im Gegensatz dazu haben VEGF189 und VEGF206 eine sehr viel stärkere Affinität zu Molekülkomplexen aus Kohlenhydraten und Proteinen der Zelloberfläche und der extrazellulären Matrix (Heparin-Sulfat-enthaltende Proteoglykane), diffundieren aber entsprechend schlechter und besitzen ein geringeres angiogenes Potential (Weindel et al., 1992). Grundsätzlich produzieren die meisten Zellen verschiedene VEGF-Isoformen gleichzeitig, während der Frakturheilung sind jedoch die Splicevarianten VEGF121 und VEGF189 vorherrschend (Petersen et al., 2001).

VEGF-Zell-Rezeptoren konnten erstmals 1990 identifiziert und charakterisiert werden (Vaisman et al., 1990). Es handelt sich hierbei um intrazelluläre membranständige Rezeptoren. VEGF-Rezeptoren gehören der Untergruppe der Tyrosinkinase-Rezeptoren an. Es werden drei Subtypen unterschieden: VEGFR-1 (fms-like tyrosine kinase 1 [flt-1]) (Deckers et al., 2000), VEGFR-2 (fetal liver kinase 1 [flk-1]) (Tischer et al., 1989; Yang & Cepko, 1996) und VEGFR-3 (fms-like tyrosine kinase 4 [flt-4]) (Jussila et al., 1998). VEGF121 und VEGF165 werden von VEGFR-1, VEGF145 zusätzlich von VEGFR-2 gebunden (Neufeld et al., 1999).

VEGF-Rezeptoren werden sowohl von Endothelzellen als auch von unterschiedlichen anderen Zelltypen wie etwa Trophoblasten (Charnock-Jones et al., 1994), Monozyten (Barleon et al., 1996), Lymphgefäß-Zellen (Jussila et al., 1998), renalen Mesangiumzellen (Takahashi et al., 1995), hämatopoetischen Stammzellen (Katoh et al., 1995), Megakaryozyten, retinalen Vorläuferzellen (Chavakis et al., 2002) Tumorzellen, Osteoblasten und Chondrozyten (Pufe et al., 2002) exprimiert.

VEGF ist ein essentieller Wachstumsfaktor im Rahmen der Organogenese des kardiovaskulären Systems (Carmeliet et al., 1996; Ferrara et al., 1996). Im adulten Lebensalter spielt VEGF eine wichtige Rolle während physiologischer Reproduktions- und Regenerationsprozessen wie etwa dem weiblichen Ovarialzyklus (Lee et al., 1997; Torry et al., 1996) oder im Rahmen der Wund- und Frakturheilung (Ferrara, 1999). Eine vermehrte Expression von VEGF konnte aber auch im Rahmen von pathologischen Prozessen wie etwa

der diabetischen Retinopathie (Chavakis et al., 2002), der altersbedingten Makuladegeneration, der rheumatischen Arthritis (Pufe et al., 2001) und vor allem der Tumorgenese (Kakeji et al., 2002; Paydas et al., 2002; Restucci et al., 2002) nachgewiesen werden. Über eine Stimulation der NO-Synthase in Endothelzellen scheint VEGF zudem eine Gefäßdilatation im Rahmen der physiologischen Herz-Kreislauf-Regulation zu bewirken (Yang et al., 1996).

Während VEGF maßgeblich an verschiedenen Reparationsprozessen der Knochenbruchheilung beteiligt ist (Ferguson et al., 1999), lässt es sich im unfrakturierten Knochen nicht nachweisen (Pufe et al., 2002). So ist VEGF in der frühen Phase der Frakturheilung vor allem für die Revaskularisierung des Frakturareals verantwortlich. Zu diesem Zeitpunkt wird VEGF primär von Thrombozyten innerhalb des Frakturhämatoms exprimiert (Maloney et al., 1998). Einsprießende Endothelzellen sowie migrierende Entzündungszellen wie Granulozyten, Makrophagen und Monozyten produzieren konsekutiv Wachstumsfaktoren wie FGF (fibroblast growth factor) (Baird et al., 1985), PDGF (platelet derived growth factor) (Shimokado et al., 1985), TGF- $\beta$  (transforming growth factor-beta) (Saadeh et al., 1999) sowie Interleukin 1 und 6 (Einhorn et al., 1995), welche ihrerseits wiederum die Produktion von VEGF stimulieren (Bolander, 1992) und damit erneut Entzündungszellen anlocken (Einhorn et al., 1995). Überdies hinaus wird die Expression und Freisetzung von VEGF durch BMP-2 (bone morphogenetic protein 2) (Bouletreau et al., 2002) und Prostaglandine (Saadeh et al., 2000) stimuliert.

Im weiteren Verlauf der Frakturheilung vermittelt VEGF die Proliferation und Differenzierung von Fibroblasten, Osteoblasten und Chondroblasten aus mesenchymalen Vorläuferzellen (Gerber & Ferrara, 2000; Harada et al., 1995; Carlevaro et al., 2000). Osteoblasten und Chondroblasten sezernieren im reifen Zustand selber VEGF und stimulieren dabei ihrerseits die umgebenden Zellen (Carlevaro et al., 2000). Während in ruhenden und proliferierenden Knorpelzellen kein VEGF gebildet wird (Harper & Klagsbrun, 1999), nimmt die VEGF-Produktion sowie Gefäßneubildung mit dem Grad der Chondrozytenhypertrophie zu. Zeitgleich sprießen vom Knochen ausgehende Blutgefäße in den avaskulären Knorpel ein. Chondroklasten, die vermutlich aus einwachsenden Gefäßsprossen migrieren, bauen Knorpelmatrix ab und ermöglichen dadurch die Formierung neuen Geflechtknochens (Carlevaro et al., 2000; Gerber et al., 1999; Harper & Klagsbrun, 1999).



In tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Blockierung des VEGF-Rezeptors VEGFR-3 zu einer deutlichen Volumenminderung des knöchernen Kallus führt (Street et al., 2002). Im Gegensatz dazu vermittelt die exogene Gabe von VEGF eine gesteigerte Osteoblastenaktivität und Kallusvaskularisierung (Geiger et al., 2005).

## **2.4 Frakturmodelle**

Obwohl in der Vergangenheit zahlreiche Erkenntnisse über die Physiologie der Knochenbruchheilung durch klinische Studien am Menschen sowie durch in-vitro-Studien gewonnen werden konnten, sind bis heute Tiermodelle essentieller Bestandteil der Frakturheilungsforschung. In diesem Zusammenhang wurden zahlreiche Frakturmodelle an verschiedenen Säugetier- und Vogelarten entwickelt. In Abhängigkeit von der jeweiligen Fragestellung der Studie wurden Spezies unterschiedlichster Größe und Anatomie von Kleinnagetieren wie der Maus (Hiltunen et al., 1993b) bis hin zu Großtiersäugern wie etwa dem Schaf (Cheal et al., 1991; Kirker-Head et al., 1995) als Versuchstiere gewählt. Konsekutiv sollten Unterschiede in der Anatomie der Spezies sowie der entsprechenden Biologie der Knochenbruchheilung in dem Aufbau der Experimente und in der Interpretation der Ergebnisse Beachtung finden, da eine Übertragbarkeit der Studie auf den Menschen immer diskutiert werden muss (Rhineland, 1974).

Seitens der Anatomie haben kleine Nagetiere wie Mäuse und Ratten den Nachteil, dass sie eine recht primitive Knochenstruktur ohne Havers-System aufweisen. Kleine Nagetiere benutzen für das Remodeling im Rahmen der Knochenbruchheilung Resorptionshöhlen, die sich in der Nähe der Fraktur bilden und sich in späteren Stadien der Knochenbruchheilung mit Osteoblasten auffüllen. Obwohl dieser Vorgang dem Remodeling bei vorhandenem Havers-System sehr ähnlich ist, ist über die Relevanz dieser biologischen Unterschiede noch wenig bekannt. Entsprechend können kleine Nagetiere nicht für Studien verwendet werden, die die Form, die Funktion und die Beschaffenheit des Havers-Systems untersuchen. Phylogenetisch tritt das Havers-System erst bei Kaninchen auf, wenn auch hier mit anatomischen Unterschieden zum Havers-System des Menschen (Nunamaker, 1998).

Trotz großer Ähnlichkeiten im Genom der verschiedenen Säugetiere werden bestimmte Gene in Abhängigkeit von der jeweiligen Spezies zu unterschiedlichen Zeitpunkten exprimiert. In tierexperimentellen Studien sollten daher Spezies-abhängige Unterschiede in der zeitlichen

Expression von Zytokinen stets Beachtung finden. Entsprechend ist die Dosierung sowie der Applikationszeitpunkt von Zytokinen im Rahmen tierexperimenteller Studien immer zu diskutieren (Nunamaker, 1998).

Ein weiteres wichtiges Kriterium in der Auswahl eines entsprechenden Tiermodells liegt in der unterschiedlichen Response verschiedener Spezies auf Medikamente. So weisen verschiedene Tierarten ein völlig unterschiedliches Metabolisierungspotential bestimmter Wirkstoffe auf. Dies führt zu differenten Effekten der Medikamente auf den Organismus der jeweiligen Spezies und erfordert somit auch eine Anpassung der Applikationsdosis. Ein Beispiel hierfür ist die toxische Wirkung von nichtsteroidalen Antiphlogistika auf Katzen und Hunde (Herrgesell, 1967; Jones et al., 1992).

Des Weiteren ist bekannt, dass das Alter der Versuchstiere einen entscheidenden Einfluss auf die Frakturheilung nimmt. So weist etwa ein juveniler Knochen einen schnelleren Heilungsablauf auf, als ein seniler Knochen (Lu et al., 2005; Rossant & Nagy, 1995). Als Hinweis auf ein abgeschlossenes Knochenwachstum sollte ein Schluss der Wachstumsfuge radiologisch nachweisbar sein (Nunamaker, 1998).

### **2.4.1 Maus**

Im Laufe der letzten Jahrzehnte wurden zahlreiche Tiermodelle für die Reproduktion physiologischer und pathologischer Prozesse während der Frakturheilung entwickelt. Während primär Großtiermodelle zur Untersuchung der Knochenbruchheilung benutzt wurden, haben sich in jüngerer Vergangenheit zunehmend Kleintiermodelle vor allem an der Maus etabliert. Aufgrund der geringen Kosten für die Beschaffung, Zucht und Haltung dieser Spezies sind große Versuchsgruppen gut realisierbar. Das Genom der Maus ist in seiner Gesamtheit entschlüsselt, was einen enormen Vorteil in der Durchführung molekularbiologischer Studien darstellt. Konsekutiv existiert für keine andere Spezies ein derart großes Spektrum verfügbarer transgener Stämme sowie spezifischer Antikörper (Rossant & Nagy, 1995). Wie oben bereits erwähnt besitzt die Maus –wie auch die Ratte– im Gegensatz zu größeren Tieren eine recht primitive Knochenstruktur ohne Havers-System. Diese anatomische Besonderheit sollte im Hinblick auf die Übertragbarkeit von Ergebnissen auf den Menschen stets beachtet werden. Eine große Herausforderung in der Entwicklung von Frakturmodellen an der Maus stellt die diffizile Anatomie dieser Spezies dar. So verlangt die

Frakturierung und osteosynthetische Stabilisierung eines Mäusefemurs mit einer Länge von etwa 15 mm und einem Durchmesser von etwa 1,5 mm ein hohes Maß technischen und operativen Geschicks (Holstein et al., 2007a).

In den bis dato publizierten Frakturmodellen an der Maus wurde die Knochenbruchheilung vor allem an der Rippe, der Tibia sowie dem Femur untersucht (Bourque et al., 1992; Hiltunen et al., 1993b; Holstein et al., 2007a; Nakase et al., 1994; Manigrasso & O'Connor, 2004).

Frakturmodelle an Rippen eignen sich aufgrund der ungünstigen Anatomie nicht für biomechanische Testmethoden und wurden daher fast ausschließlich für Genexpressionsanalysen während der Frakturheilung angewandt (Ito et al., 1999; Nakase et al., 1994; Yamagiwa et al., 1999).

Im Gegensatz zur Rippe eignen sich die Tibia sowie das Femur gut für biomechanische Testungen. Die anatomischen Vorteile des Mäusefemurs gegenüber der Tibia liegen in einem einheitlichen runden Querschnitt bei guter Weichteildeckung (Cheung et al., 2003). Grundsätzlich wird bei Tibia- und Femurfrakturmodellen an Maus und Ratte zwischen geschlossener und offener Frakturierung unterschieden. Die geschlossenen Frakturmodelle lassen sich im Wesentlichen auf das von Bonnarens und Einhorn 1984 an der Ratte beschriebene Modell zurückführen (Bonnarens & Einhorn, 1984). Basierend auf einer stumpfen Guillotine, wird hierbei ein standardisierter transverser Frakturverlauf unter minimalem Weichteilschaden erzeugt. Das entsprechende Modell an der Maus wurde von Hiltunen und Kollegen 1993 an der Tibia sowie von Manigrasso und O'Connor 2004 am Femur publiziert. Für die offene Femurfrakturierung wird meist ein lateraler longitudinaler Zugang gewählt, um den Knochen unter Sicht zu frakturieren oder zu osteotomieren (Cheung et al., 2003). In den meisten Frakturmodellen an Maus und Ratte werden Femur bzw. Tibia nach definierten Zeitabschnitten explantiert und die Knochenbruchheilung mit radiologischen, biomechanischen und histologischen Methoden analysiert. Die biomechanische Testung wird mehrheitlich als Dreipunkt-, Vierpunkt- oder Rotationsmessung durchgeführt (Holstein et al., 2007a).

Als großer Nachteil der intramedullären Pin-Stabilisierung, die mehrheitlich als Osteosynthesetechnik an der Maus eingesetzt wird, ist die unzureichende Rotationsstabilität im Frakturbereich anzusehen. Außerdem war aufgrund der schwierigen Reposition eine

Frakturierung primär nur nach vorheriger Implantateinbringung möglich (Manigrasso & O'Connor, 2004). Durch die von Cheung und Kollegen beschriebene Osteosynthese mittels Fixateur externe wird im Gegensatz zur Marknagelung eine suffiziente Stabilität im Frakturspalt erzielt (Cheung et al., 2003). Die Nachteile dieses Modells liegen allerdings in einem hohen Implantatgewicht mit konsekutiver Behinderung des physiologischen Bewegungsablaufes der Maus sowie in einer schwierigen Operationstechnik. Da die Pins offen eingebracht werden müssen, besitzt dieses Verfahren eine höhere Invasivität als die Marknagelung. Zudem haben kleine Materialunterschiede große Auswirkungen auf die Frakturstabilität, was eine vorangehende aufwendige mechanische Materialtestung nötig macht (Cheung et al., 2003).

Um das „mechanical environment“ innerhalb des Frakturspalt zu standardisieren, entwickelte unsere Arbeitsgruppe kürzlich ein Verriegelungsmarknagel-Modell, in dem durch eine beidseitige Abflachung einer herkömmlichen Spritzkanüle erstmals eine rotationsstabile geschlossene Osteosynthese erreicht wurde (Holstein et al., 2007a). Im Gegensatz zu dem Fixateur externe, als bis dato einzigem rotationsstabilen Osteosyntheseverfahren an der Maus, erfordert das Verriegelungsmarknagel-Modell keinen offenen Zugang. Unter Verwendung eines Führungsdrahtes ist zudem eine geschlossene Frakturierung ohne liegendes Implantat möglich (Holstein et al., 2007a).

## **2.4.2 Ratte**

Im Gegensatz zur Maus ist die Ratte schon seit längerer Zeit als Tiermodell für die Untersuchung der Frakturheilung etabliert. Dabei werden Femur, Tibia, Schädel, Metatarsale, Radius und Ulna als Frakturlokalisierung genutzt (Hietaniemi et al., 1995; Utvag et al., 1994). Der große Vorteil der Ratte gegenüber der Maus liegt in ihrer Körpergröße, was vor allem das operative Handling, aber auch die biomechanische Knochentestung deutlich erleichtert. Grundsätzlich sind die Tibia- und Femur-Frakturmodelle an der Ratte mit denen an der Maus vergleichbar. So wurden instabile Pin-Osteosynthesen (Bonnarens & Einhorn, 1984) mittlerweile auch an der Ratte weitgehend durch stabile Fixationstechniken mittels Verriegelungsmarknagel, Platte, sowie Fixateur externe ersetzt (Drosse et al., 2008; Kaspar et al., 2007; Russel et al., 2007; Schoen et al., 2008; Willie et al., 2008; Wingerter et al., 2007).

### **2.4.3 Kaninchen**

Neben Ratte und Maus ist das Kaninchen die dritte Nagetier-Spezies, die für Studien zur Knochenbruchheilung genutzt wird. (Ashhurst et al., 1982; Stafford et al., 1994; Strong et al., 1992). Aufgrund der Körpergröße dieser Tierart sind biophysikalische Untersuchungen praktikabler als bei Klein-Nagern. Stabilisierungssysteme, die vor allem an der Maus eine hohe technische Herausforderung darstellen, wie etwa Fixateur externe, Platte, Schraube, oder Verriegelungsnagel sind am Kaninchen ohne allzu großen technischen Aufwand zu konstruieren und anzuwenden (Brighton et al., 1985; Danckwardt-Liliestrom et al., 1970; Deibert et al., 1994; Kaplan et al., 1985; Terjesen & Johnson, 1986). Im Gegensatz zu größeren Säugetieren wie etwa dem Hund oder Schaf erlaubt die Körpergröße des Kaninchens die Applikation höherer Dosen kostenintensiver Substanzen. Entsprechend sind auch die Kosten für Anschaffung, Zucht und Haltung von Kaninchen gegenüber Groß-Säugetieren überschaubar (Critchlow et al., 1995).

### **2.4.4 Katze**

Die Knochenbruchheilung an der Katze wurde bislang sowohl im Rahmen von veterinärmedizinischen Therapiestudien als auch im Rahmen von Forschungsarbeiten an Frakturmodellen untersucht (Henry et al., 1985; Puech et al., 1990; Toombs et al., 1985). Dabei wurden verschiedenste Methoden hinsichtlich operativer Stabilisierung sowie konservativer Behandlung von Frakturen aber auch hinsichtlich des Einheilverhaltens von Knochen-Allografts beschrieben (Henry et al., 1985; Puech et al., 1990). Die Anatomie der langen Röhrenknochen der Katze, insbesondere des Femurs begünstigt aufgrund einer langen und geraden Konfiguration die Einbringung von intramedullären Implantaten aber auch von Platten- und Schrauben-Osteosynthesen (Toombs et al., 1985).

### **2.4.5 Hund**

Da die Frakturheilung am Hund von großem Interesse für die Veterinärmedizin ist, sind viele Informationen über die Behandlung und die biologischen Heilungsabläufe von Frakturen am Hund verfügbar (Johnson & Stein, 1988). Aber auch im Rahmen von tierexperimentellen Studien ist der Hund ein beliebtes Modell für die Untersuchung der Frakturheilung. Hierbei

wurden zahlreiche Frakturmodelle mit internen und externen Stabilisierungstechniken, aber auch Modelle ohne Stabilisierung sowie Modelle mit verzögerter und ausbleibender Frakturheilung entwickelt (Black et al., 1985; Chao et al., 1989; Daum et al., 1983; Davy & Connolly, 1982; Egger et al., 1993; Georgiadis et al., 1990; Heckman et al., 1991; Lenehan et al., 1985; Muller et al., 1968; Lewallen et al., 1984; Peter et al., 1996; Roush & Wilson, 1990; Volpon, 1994).

#### **2.4.6 Schaf**

Vor allem für die Entwicklung und Testung neuer Human-Implantate ist das Schaf ein beliebtes Versuchstier (Cheal et al., 1991; Kirker-Head et al., 1995; Richardson & Nunamaker, 1991; Steen et al., 1988; Steen & Fjeld, 1989). So nutzte etwa die Association for the Study of Internal Fixation (ASIF) wiederholt das Schaf als Versuchstier für die Untersuchung der Frakturheilung unter Verwendung einer Plattenosteosynthese (Nunamaker & Perren, 1979; Perren et al., 1969; Schenk & Willenegger, 1977). Entsprechend ist die primäre Knochenheilung an dieser Spezies, bei der das Remodeling über das Havers-System erfolgt, gut beschrieben (Schenk & Willenegger, 1977). Des Weiteren wurden Schafe aber auch für Studien zur intramedullären Marknagelung verwendet (Schemitsch et al., 1994; Schemitsch et al., 1995; Steen & Fjeld, 1989). Da Schafe die behandelte Extremität früh belasten, sind Studien, die die sekundäre Frakturheilung nach intramedullärer Stabilisierung untersuchen am Schaf aufgrund des erwünschten Kompressionseffektes gut durchführbar. Die relativ hohen Kosten für Zucht und Haltung der Tiere erschweren die Verwendung großer Versuchsgruppen (Nunamaker, 1998).

#### **2.4.7 Ziege**

Im Gegensatz zum Schaf hat sich die Ziege als Versuchstier zur Untersuchung der Knochenbruchheilung bis dato nicht durchgesetzt (Curtis et al., 1995). Die hohe Inzidenz von Pathologien und Erkrankungen des Bewegungs- und Stützapparates -wie etwa die infektiöse Ziegenarthritis- limitieren die Aussagekraft von konventionellen Frakturheilungsstudien an dieser Spezies (Adams et al., 1983).

### **2.4.8 Pferd**

Aufgrund des hohen Körpergewichtes und der hohen Haltungs- und Zuchtkosten ist das Pferd als Versuchstier für Frakturheilungsstudien nicht geeignet. Als Folge einer mangelnden Compliance ist eine suffiziente Frakturheilung selbst unter hohem veterinärmedizinischem Aufwand häufig nicht möglich. Entsprechend ist der Versuch einer osteosynthetischen Frakturversorgung am Pferd eine enorme technische und veterinärmedizinische Herausforderung, die tierexperimentelle Studien an dieser Spezies nicht gerechtfertigt (Nunamaker et al., 1991).

### **2.4.9 Primat**

Die Knochenstruktur von Primaten ist entsprechend der Phylogenese mit der des Menschen größtenteils vergleichbar. Aus ethischen Gründen sind Studien zur Frakturheilung an Primaten dennoch weitestgehend obligat (Nunamaker, 1998).

## **2.5 Rapamycin**

### **2.5.1 Historie**

Rapamycin (Sirolimus) konnte erstmals vor über 25 Jahren aus einer Bodenprobe der Osterinsel Rapa Nui isoliert werden (Morris, 1992). Es handelte sich hierbei um ein Makrolidantimykotikum, welches von dem Bakterium *Streptomyces hygroscopicus* hervorgebracht wird. Folglich galt das ursprüngliche Interesse an Rapamycin primär seiner antimykotischen Wirkung. Die bald beobachtete Immunsuppression der behandelten Patienten war allerdings eine inakzeptable Nebenwirkung hinsichtlich der Anwendung als Antimykotikum. Obwohl in den Folgejahren zusätzlich eine Proliferationshemmung von Tumorzellen durch Rapamycin nachgewiesen wurde, konnte eine klinische Anwendung zunächst nicht etabliert werden. Als im Laufe der achtziger Jahre die immunsuppressiven Eigenschaften des -neben Cyclosporin- zweiten Calcineurininhibitors (CNI) Tacrolimus (FK506) entdeckt wurden, und sich eine strukturelle Ähnlichkeit zu Rapamycin zeigte, trat der Anwendungsbereich von Rapamycin als Immunsuppressivum in den Fokus der Forschung

(Camardo, 2003). Rapamycin (Rapamune®) wurde schließlich 1999 in den USA und 2001 in Deutschland zur immunsuppressiven Therapie nach Nieren- und Lebertransplantation zugelassen.

### 2.5.2 Struktur

Rapamycin ist ein 31-gliedriges Makrolid mit der Summenformel  $C_{51}H_{79}NO_{13}$  (Abb. 1) und der Molmasse 914,172 g/mol. Der Schmelzpunkt von Rapamycin liegt bei etwa 184 °C. Aus den 15 Chiralitätszentren des Moleküls ergibt sich eine große Anzahl möglicher Stereoisomere. Zusammengefasst repräsentiert Rapamycin eine neue Klasse therapeutischer Agenzien mit immunsuppressiven und antikanzerogenen Eigenschaften (Kirken & Wang, 2003).

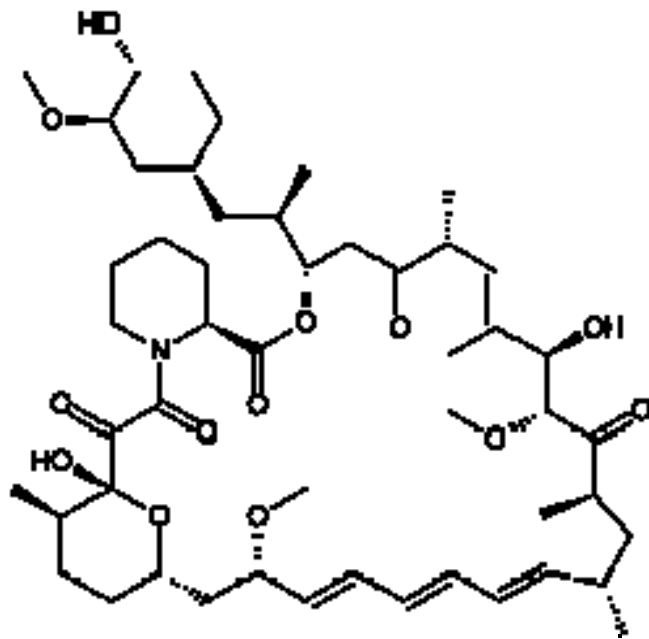


Abb. 1: Strukturformel von Rapamycin



### **2.5.3 Wirkmechanismus**

Trotz struktureller Ähnlichkeiten besitzt Rapamycin einen völlig anderen Wirkmechanismus als Calcineurininhibitoren, so dass Rapamycin als erster Vertreter einer neuen Substanzklasse angesehen wird. Als Zielstruktur im Zytoplasma besitzt diese Substanzklasse ein Immunophilin, das so genannte FK-bindende Protein (FKBP-12). Dieses Protein, das auch eine Verbindung mit Tacrolimus eingeht, besteht aus 107 Aminosäuren, die zentral als  $\alpha$ -Helix und um diese herum als  $\beta$ -Faltblatt strukturiert sind (Van Duyne et al., 1993). Zwischen diesen beiden Anteilen eingebettet befindet sich die Bindungsstelle für Rapamycin. Trotz des gleichen Zielproteins unterscheiden sich die Effekte des Rapamycin-FKBP-12-Komplexes von denen des Tacrolimus-FKBP-12-Komplexes. Der Tacrolimus-FKBP-12-Komplex (ebenso wie der Cyclosporin-Cyclophilin-Komplex) inhibiert als Zielstruktur Calcineurin. Im Gegensatz dazu konnte als Zielstruktur des Rapamycin-FKBP-12-Komplexes ein Protein identifiziert werden, das als „mammalian target of rapamycin“ (mTOR) bezeichnet wurde (Abraham & Wiederrecht, 1996). Über die Hemmung von mTOR beeinflusst der Rapamycin-FKBP-12-Komplex den Zellzyklus. Während Tacrolimus und Cyclosporin A den Zellzyklus in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase blockieren, inhibiert Rapamycin den Zellzyklus von aktivierten T-Zellen in der G<sub>1</sub>/S-Phase (Sigal & Dumont, 1992). Hierbei werden die S6-Proteinkinase-vermittelte Proteinsynthese sowie die Interleukin-2-vermittelte Zellproliferation unterdrückt. Folglich führt Rapamycin zu einer Inhibition der T-Zell-assoziierten Immunabwehr.

### **2.5.4 Pharmakokinetik**

Rapamycin ist als Lösung sowie als Tablette zur oralen Einnahme erhältlich. Die Resorptionsrate von Rapamycin im Darm ist gering, so dass die Bioverfügbarkeit bei oraler Gabe nur etwa 15 % beträgt. Die Initialdosis wird hoch angesetzt und langsam an die Erhaltungsdosis angeglichen, um einen Plasma-Wirkspiegel von 10-20 ng/ml zu erzielen. Rapamycin wird in der Darmwand und in der Leber von dem P450-Isoenzym CYP3A4 metabolisiert. Die Halbwertszeit bei nierentransplantierten Patienten beträgt etwa 60 Stunden.

### **2.5.5 Indikationen und Anwendung**

In der Klinik gewinnt Rapamycin als Immunsuppressivum für die Induktions- und Erhaltungstherapie nach Leber-, Nieren- und Herztransplantationen aufgrund seiner antikanzerogenen Eigenschaften zunehmend an Bedeutung (Camardo, 2003). Anfänglich wurde Rapamycin verwendet, um die Inzidenz chronischer Rejektion vor allem bei CNI-induzierter Niereninsuffizienz zu reduzieren. Später wurde das Indikationsspektrum von Rapamycin um die Immunsuppression nach Lebertransplantation erweitert, vor allem bei steroidresistenter Abstoßungsreaktion, sowie bei einer begleitenden CNI-induzierten Nephropathie.

Die Rejektionstherapie wird unter normalen Umständen zunächst mit einer Methylprednisolon-Stoßtherapie durchgeführt. In einigen Fällen ist jedoch bei steroidresistenten Abstoßungsreaktionen die Umstellung auf Anti-Thymozyten-Globulin (ATG) oder Rapamycin indiziert. Das Fehlen der CNI-abhängigen Nephrotoxizität ist einer der bedeutendsten Vorteile von Rapamycin gegenüber Cyclosporin und Tacrolimus (Trotter, 2003). So verursachen CNI nicht selten akute tubuläre Nekrosen, in deren Folge eine akute Niereninsuffizienz entstehen kann. Eine Regeneration der Nierenfunktion ist durch die medikamentöse Umstellung auf Rapamycin möglich (Muller et al., 2002).

Tacrolimus und Cyclosporin können ferner durch eine direkte Beeinflussung des Astrozyten-Metabolismus eine CNI-induzierte Neurotoxizität hervorrufen (Serkova et al., 1997). Die Neurotoxizität äußert sich klinisch durch Epilepsien, Tremor, sowie eine Vigilanzminderung bis hin zum Koma des Patienten. Hierbei ist ebenfalls eine Besserung der Symptome durch einen „Switch“ auf Rapamycin möglich.

Die immunsuppressive Wirkung von Rapamycin ist auch in der Dermatologie von Interesse. Aufgrund seiner entzündungshemmenden Eigenschaften gewinnt Rapamycin als mögliche Alternative zu Glukokortikoiden in der äußerlichen Behandlung chronisch-entzündlicher Hauterkrankungen wie etwa des atopisches Ekzems oder der Psoriasis vulgaris zunehmend an Bedeutung (Muller et al., 2002).

Des Weiteren findet Rapamycin Anwendung zur Immunsuppression bei begleitend vorbestehender Tumorerkrankung (Neff et al., 2003). Dies betrifft insbesondere Patienten mit

Lebertumoren, die durch eine Leberresektion mit konsekutiver Leberteiltransplantation therapiert werden (Trotter, 2003).

Rapamycin hemmt sowohl das Wachstum von Primärtumoren als auch das von Metastasen (Stallone et al., 2005). Die Wachstumshemmung scheint vor allem über eine Inhibition der Tumor-Angiogenese erzielt zu werden. Das antiangiogene Potential von Rapamycin basiert dabei auf einer Reduzierung der Freisetzung des Wachstumsfaktors VEGF als zentralem Regulator der Gefäßneubildung. Neben einer Angiogenesehemmung wird zusätzlich eine direkte Proliferationshemmung der Tumorzellen diskutiert (Stallone et al., 2005).

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass Rapamycin die Proliferationsrate glatter Gefäßmuskelzellen reduziert und so eine überschießende Intimaproliferation hemmt. Dieser Wirkmechanismus erlaubt zusätzlich die Anwendung zur Prophylaxe einer Graftsklerose als Folge einer chronischen Rejektion (Pfitzmann et al., 2001).

In der Kardiologie wird Rapamycin neben der systemischen Applikation zur Immunsuppression nach Herztransplantation auch „lokal“ zur Behandlung der koronaren Herzkrankheit angewandt. Hierbei werden Rapamycin-beschichtete Stents als Restenoseprophylaxe durch eine Proliferationsinhibition glatter Muskelzellen eingesetzt (Muller et al., 2002).

### **2.5.6 Nebenwirkungen**

Periphere Ödeme (39,8 %) und Hyperlipidämien (21,4 %) treten als häufigste Nebenwirkungen der Therapie mit Rapamycin auf (Kahan, 2002). Weitere häufig beobachtete unerwünschte Arzneimittelwirkungen (bei mehr als 10 % der Patienten) von Rapamycin sind: Thrombozytopenien, Anämien, Leukopenien, Hypokaliämien, Infektionen des Harntraktes, abdominelle Beschwerden wie etwa Diarrhoe, Lymphocelen, Arthralgien, Akne, sowie eine Erhöhung der Laktat-Dehydrogenase (LDH) im Serum. Diese Nebenwirkungen nehmen häufig nach Reduzierung der Dosierung (Podbielski & Schoenberg, 2001) und Kombination mit einem anderen Immunsuppressivum ab (Kuypers, 2005). Zusätzlich konnten thrombembolische Ereignisse, vor allem Leberarterienthrombosen (HAT) (Barone et al., 2003; Saikali et al., 2003), sowie Wundheilungsstörungen (Ekici et al., 2007; Guilbeau, 2002; Zakliczynski et al., 2007) nach Einnahme von Rapamycin nachgewiesen werden.

## 2.6 Zielsetzung

Ziel der Arbeit war es, zu untersuchen, ob Rapamycin die Frakturheilung beeinflusst.

Die entsprechenden Informationen dazu sollten durch tierexperimentelle Versuche an der Maus nach einem bewährten Tiermodell gewonnen werden.

## 2.7 Fragestellung

Die durchgeführten tierexperimentellen Studien sollten die Frage beantworten, inwieweit ein Unterschied zwischen der Frakturheilung unter gleichzeitiger Behandlung mit Rapamycin gegenüber der Frakturheilung ohne entsprechende Behandlung besteht. Dabei war bisher nicht bekannt, ob Rapamycin den Ablauf der Frakturheilung hemmt, unbeeinflusst lässt oder gar fördert.

Die Nullhypothese lautet:

**„Die Frakturheilung Rapamycin-behandelter Mäusen (Verum) weist keinerlei Unterschiede verglichen mit der Frakturheilung unbehandelter Mäuse (Kontrollen) auf.“**

Die Knochenbruchheilung wurde zwei und fünf Wochen nach Frakturierung mit Hilfe radiologischer, biomechanischer, histomorphometrischer, sowie proteinbiochemischer Methoden am postmortalen Knochen-Präparat untersucht.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Intervention

#### 3.1.1 Versuchsprotokoll

Der Tierversuch wurde von der zuständigen Behörde (Dezernat 5, Saarpfalz-Kreis, 66406 Homburg/Saar) unter dem AZ K110/180-07 genehmigt und am Institut für klinisch-experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

Für die Versuchsdurchführung wurden 69 Mäuse verwendet. 35 Tiere wurden mit Rapamycin, 34 weitere Tiere als Kontrolle mit der entsprechenden Trägersubstanz behandelt. Die Auswertung der Knochen erfolgte zwei Wochen, bzw. fünf Wochen nach Frakturierung mit Hilfe radiologischer, biomechanischer, histomorphometrischer und proteinbiochemischer Methoden (Tab. 1).

<i>Standzeit</i>	<b>Rapamycin</b>		<b>Kontrollen</b>	
	<i>2 Wochen</i>	<i>5 Wochen</i>	<i>2 Wochen</i>	<i>5 Wochen</i>
Radiologie	n = 16	n = 16	n = 16	n = 15
Biomechanik	n = 8	n = 8	n = 8	n = 8
Histomorphometrie	n = 8	n = 8	n = 8	n = 7
Western Blot	n = 3	-	n = 3	-

Tab. 1: Versuchsprotokoll

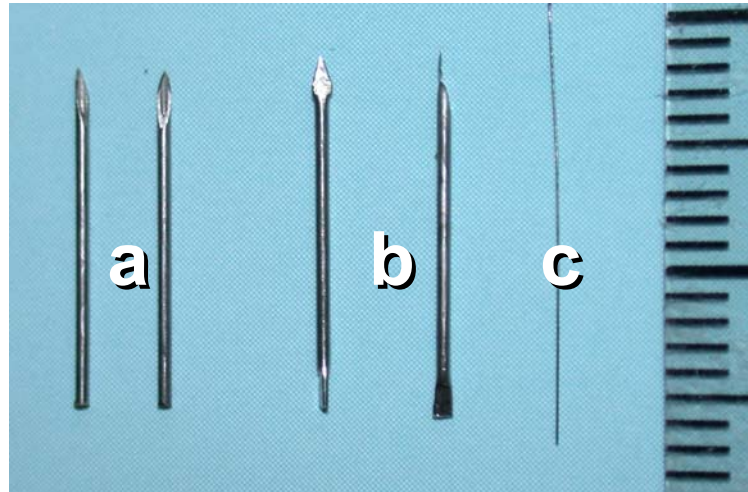
### 3.1.2 Tiermodell

Als Versuchstiere dienten ausgewachsene haarlose Mäuse (SKH1-hr) mit einem Körpergewicht von 25 - 35 g. Die Tierhaltung der Mäuse erfolgte im Institut für klinisch-experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes unter klimatisierten Raum-Bedingungen (Lufttemperatur: 22 - 24 °C, relative Luftfeuchtigkeit 60 %) bei 12-stündigem Tag- / Nachtrhythmus in Einzelkäfigen. Wasser sowie Standarddiätfutter der Firma Altromin (Altromin 1320, Altromin, Lage, Deutschland) wurden in Pelletform ad libidum bereitgestellt.

Für die Untersuchung der Frakturheilung am Tiermodell ist ein zuverlässiges Frakturmodell unabdingbare Voraussetzung (Einhorn, 1998). Während in Großtiermodellen die Anatomie, die Knochenstruktur sowie der histologische und zeitliche Ablauf der Frakturheilung mit dem Menschen relativ gut vergleichbar sind, haben diese Modelle den großen Nachteil, dass im Vergleich zu Mäusen auf keine definierten genetischen Stämme und genetisch manipulierten Tiere zurückgegriffen werden kann ( Elmstedt, 1981; Jacenko & Olsen, 1995). Aus diesen Gründen wurde in Vorversuchen ein standardisiertes Femur-Frakturmodell für die Maus entwickelt, das in Folgeversuchen auch zu Versuchen an Knockout- Stämmen herangezogen werden kann.

Für die tierexperimentelle Untersuchung von physiologischen und pathophysiologischen Abläufen der Frakturheilung sind standardisierte Versuchsbedingungen eine grundlegende Voraussetzung. Rotationsinstabile Osteosynthesetechniken sind daher für Frakturstudien ungeeignet. Ziel der Vorversuche war es somit, erstmalig einen rotationsstabilen Marknagel für das Mäusefemur zu entwickeln. Biomechanische Testungen konnten zeigen, dass eine proximale und distale Abflachung einer herkömmlichen 24-Gauge-Spritzkanüle (Abb. 2) verglichen mit einer herkömmlichen Pin-Fixierung zu einer signifikant höheren Rotationssteifigkeit nach Frakturversorgung führt. Über einen zuvor eingebrachten Führungsdraht wurde in diesem neuen Modell eine Frakturierung ohne einliegendes Implantat möglich. Dadurch ließ sich ein leicht reproduzierbares Frakturmodell schaffen, das weitestgehend einem klinischen Trauma-Szenario entspricht. Durch die geschlossene Frakturierung und Implantateinbringung wird ein minimaler Weichteilschaden verursacht. Für die Versuchstiere erwies sich dieses Modell aufgrund der hohen Frakturstabilität und der geringen Weichteiltraumatisierung als vergleichsweise gering belastend. So konnte bereits 1-2

Tage nach Operation eine volle Mobilität der Tiere bei meist physiologischem Bewegungsablauf beobachtet werden (Holstein et al., 2007a).



*Abb. 2: Durch eine proximale und distale Abflachung einer gekürzten herkömmlichen 24-Gauge-Spritzkanüle (a) wurde ein Verriegelungsmarknagel (b) für das Mäusefemur erzeugt. Die Einbringung des Implantates erfolgte über einen vorgelegten Wolfram-Führungsdraht (c).*

### 3.1.3 Operation

Die Operation wurde im Tieroperationssaal des Institutes für klinisch-experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes an allen Versuchstieren in gleicher standardisierter Weise durchgeführt.

Die Versuchstiere wurden mittels intraperitonealer Injektion von 2 % Xylazin (2 mg/kg Körpergewicht) und Ketamin (75 mg/kg Körpergewicht) narkotisiert. Des Weiteren wurden die Tiere am Operationstag und am ersten postoperativen Tag mit 0,05 ml Carprofen® analgesiert.

Nach sorgfältiger Hautdesinfektion mit Softasept® erfolgte medial der Patella eine etwa 4 mm lange Hautinzision (Abb. 3-5). Danach wurde die Kniegelenkshöhle eröffnet und die Patella nach lateral luxiert (Abb. 6). Über die Fossa intercondylaris wurde der Markraum mit einem Mikrobohrer ( $\varnothing = 0,5$  mm; 8000 Umdrehungen/Minute) eröffnet (Abb. 6). Anschließend wurde eine Spritzkanüle über den Bohrkanal vollständig in den Markraum

eingbracht, um die Markraumlänge zu bestimmen (Abb. 7). Die entsprechende Längenmarkierung wurde konsekutiv auf eine zuvor an der Spitze abgeflachte Spritzkanüle übertragen. Im nächsten Schritt wurde ein Wolfram-Führungsdraht ( $\varnothing = 0,2 \text{ mm}$ ) über den Bohrkanal in den Markraum eingebracht (Abb. 8), um das Femur bei liegendem Führungsdraht mit einer 3-Punkt-Biegeapparatur geschlossen zu frakturieren (Abb. 9-10) (Schmidmaier, 2004). Nach Bildwandler-Dokumentation der Fraktur (entsprechend AO/ASIF-Klassifikation Typ A2-3) (Koch et al., 1990) wurde die zuvor proximal abgeflachte Spritzkanüle über den Führungsdraht aufgefädelt und vorgeschoben (Abb. 11). Nach erneuter Bildwandler-Kontrolle der Implantatlage wurde der Führungsdraht konsekutiv entfernt. Die Spritzkanüle wurde schließlich entsprechend der zuvor angebrachten Längenmarkierung gekürzt und orthogonal zur proximalen Abflachung distal ebenfalls abgeflacht (Abb. 12-13). Abschließend wurde die Kanüle vollständig im Knochen versenkt (Abb. 14-15), die Patella reponiert (Abb. 16), und die Gelenkkapsel sowie die Haut mit 6-0 PDS-II-Nähten verschlossen (Abb. 16-17).





*Abb. 3: Fixierung des Beines während der Operation*



*Abb. 4: Hautschnitt über einen medio-patellaren Zugang*



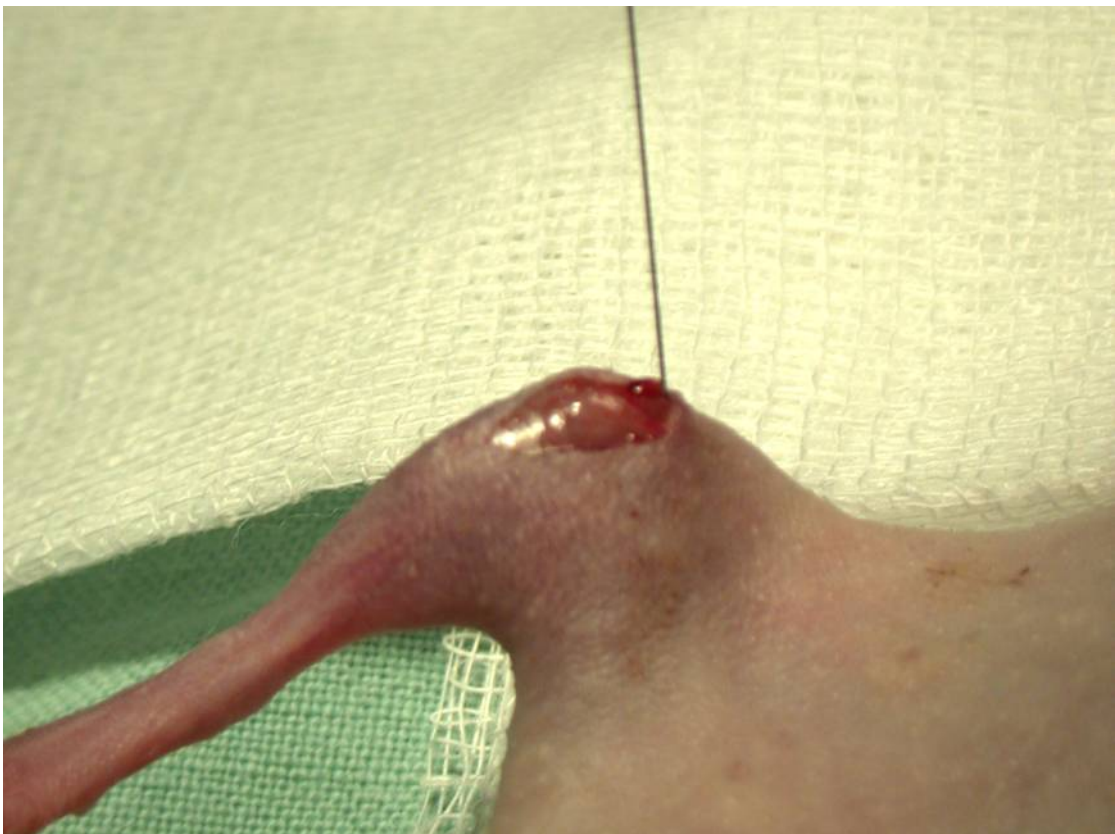
*Abb. 5: Sicht auf das Ligamentum patellae*



*Abb. 6: Markraumeröffnung im Bereich der Fossa intercondylaris nach Luxation der Patella*



*Abb. 7: Bestimmung der Markraumlänge mit einer Spritzkanüle*

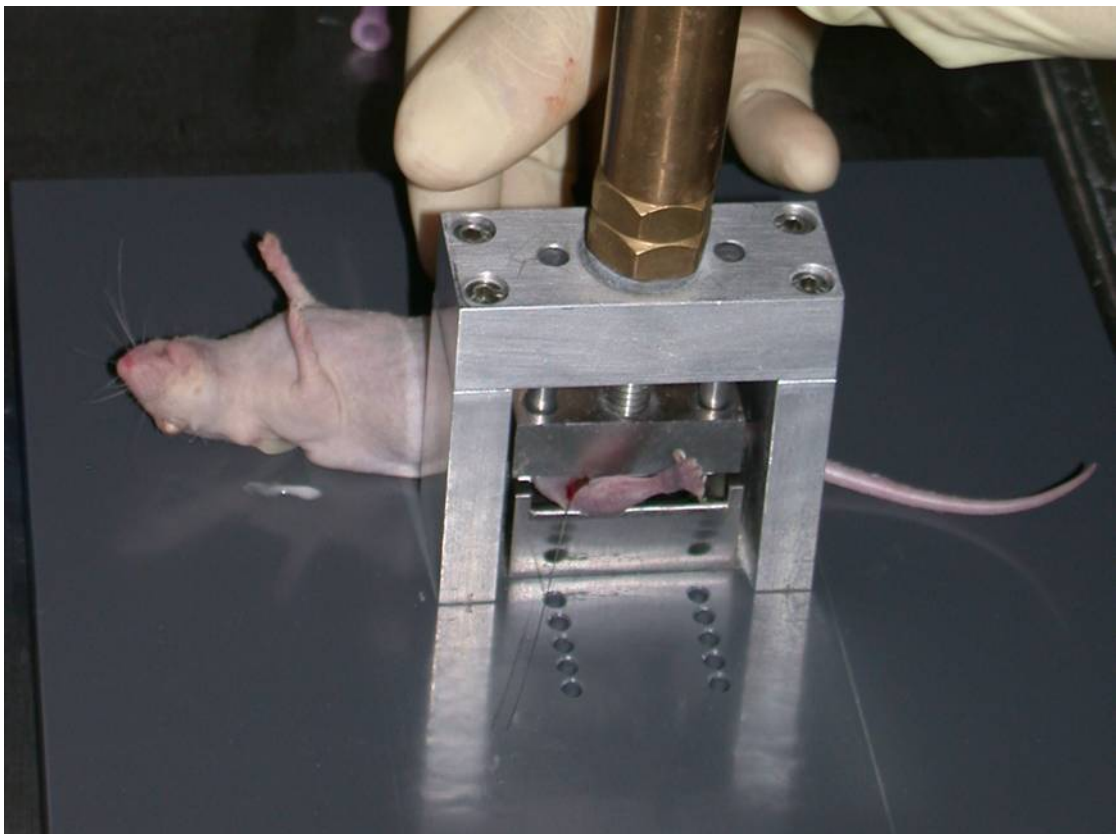


*Abb. 8: Einbringung des Führungsdrahtes*

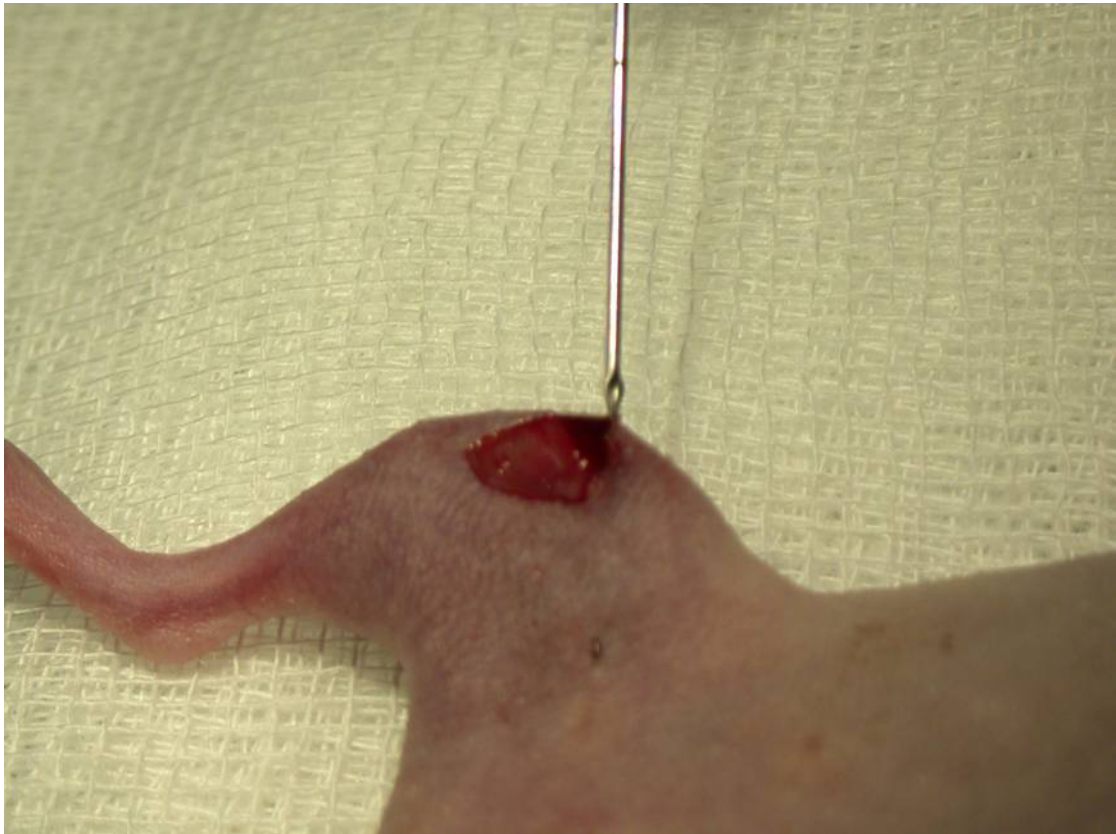




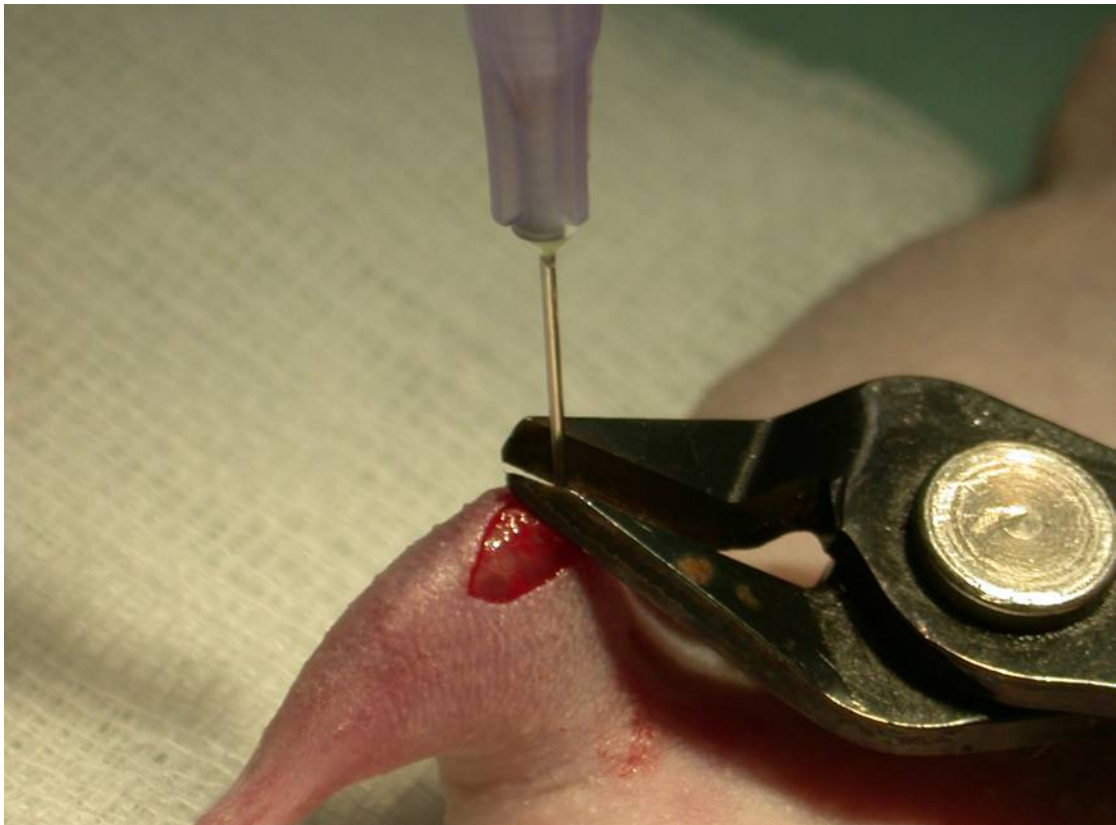
*Abb. 9: Positionierung des Beines in der Frakturapparatur*



*Abb. 10: Geschlossene Frakturierung des Femurs*



*Abb. 11: Einbringung der proximal abgeflachten Spritzkanüle*



*Abb. 12: Kürzung der Spritzkanüle entsprechend der zuvor angebrachten Längenmarkierung*



*Abb. 13: Distale Abflachung der Spritzkanüle orthogonal zur proximalen Abflachung*



*Abb. 14: Vollständige Einbringung des Marknagels*





*Abb. 15: Aufsicht auf die Fossa intercondylaris nach Einbringung des Marknagels*



*Abb. 16: Reposition und Refixation der Patellarsehne mit Verschluss des Kniegelenks*



*Abb. 17: Hautnaht*

### **3.1.4 Medikamentenapplikation**

Je nach Versuchsgruppe wurde den Tieren täglich über den Zeitraum von zwei bzw. fünf Wochen Rapamycin (1,5 mg/kg Körpergewicht) bzw. die gleiche Menge der entsprechenden Trägersubstanz intraperitoneal appliziert. Als Trägersubstanz diente zwanzigprozentiges Dimethylsulfoxid (DMSO).

### **3.1.5 Tötung der Tiere**

Die Versuchstiere wurden zwei bzw. fünf Wochen post operationem durch eine Überdosis Phenobarbital per intraperitonealer Injektion getötet.



### 3.1.6 Präparation der Knochen

Unmittelbar nach Tötung der Tiere wurde das operierte sowie das intakte kontralaterale Femur explantiert und für die weiteren Untersuchungen präpariert (Abb. 18). Hierzu wurden die Femora im Hüft- und Kniegelenk exartikuliert und der entsprechende Weichteilmantel reseziert. Die proximale und distale Epiphyse der operierten Femora wurden osteotomiert, so dass die Abflachungen des einliegenden Implantates abgesägt werden konnten. Anschließend konnte der verbleibende Pin ohne Verletzung des Frakturkallus entfernt werden.



*Abb. 18: Explantierter Knochen nach zweiwöchiger Frakturheilung*

## 3.2 Zielkriterien und Auswertung

### 3.2.1 Radiologie

Unmittelbar vor Tötung der Versuchstiere wurden in der hiesigen Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde unter Narkose seitliche Röntgenaufnahmen der betroffenen Femora angefertigt (Dentalröntgengerät Heliodent DS, Sirona Dental Systems, Bensheim, Deutschland). Hierbei wurde eine Belichtungszeit von 0,08 s bei einer Stromstärke von 7 mA und einer Spannung von 60 mV gewählt (Inside IP-21 high resolution dental films, Kodak, Rochester, USA). Nach Entwicklung der Röntgenfilme (Periomat plus, Dürr Dental, Bietigheim-Bissingen, Deutschland) wurden die Röntgenaufnahmen auf einer

Durchleuchtungsplatte mit einem Operationsmikroskop unter 4-facher Vergrößerung aufgenommen und für die weitere Analyse digitalisiert.

Die digitalisierten Röntgenaufnahmen wurden mit Hilfe des Cap Image Analysis Systems (Zeintl, Heidelberg) ausgewertet. Hierzu wurden folgende Parameter bestimmt:

- Kallusdurchmesser [mm]
- Femurdurchmesser in Höhe des Frakturspaltes [mm]
- Periostale Kallusfläche [mm<sup>2</sup>]
- Femurfläche [mm<sup>2</sup>]

Als Zielwerte wurden folgende Parameter berechnet:

- Kallusdurchmesser / Femurdurchmesser [mm<sup>2</sup>]
- Periostale Kallusfläche / Femurfläche [mm<sup>2</sup>]

### **3.2.2 Biomechanik**

Im Rahmen der biomechanischen Testung wurde die Rotationsstabilität der operierten Femora in Relation zur Rotationsstabilität der unfrakturierten kontralateralen Knochen untersucht.

Unmittelbar nach Explantation wurde hierzu der proximale und distale Femuranteil unter kontinuierlicher Anfeuchtung mittig in vorgefertigte Aluminiumhohlzylinder (Innendurchmesser 7 mm, Höhe 5 mm) belastungsstabil mit Knochenzement (Palacos®, Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland) einzementiert, und die Zylinder in die Rotationsmessapparatur (s.u.) eingespannt. Um standardisierte Messbedingungen zu garantieren, wurde bei Einzementierung der Knochen ein Abstand von 5 mm zwischen den Zylindern festgelegt.

Für die biomechanische Testung wurde eine Messapparatur zur statischen Analyse der Rotationsstabilität der Knochen konstruiert (Abb. 19). Die Messapparatur besteht aus einer fixen und einer frei rotierenden Achse. Das proximale und distale Ende des Knochens wurde

mit Hilfe der oben beschriebenen Einbettvorrichtungen an den beiden Achsen fixiert. An der freien Achse wurde ein ansteigendes Drehmoment (s.u.) angelegt, während die Drehmoment-abhängige Rotation an einer Winkelscheibe mit Hilfe eines Laser-Pointers quantifiziert wurde.

Vor Beginn der Messung wurde der Knochen über eine Drehmomentscheibe mit einem Drehmoment von 2,5 Nmm vorbelastet. Im weiteren Versuchsverlauf wurde die Torsionsbelastung schrittweise um 2,5 Nmm/min erhöht. Bei Zerstörung des Frakturkallus, bzw. bei Fraktur des intakten kontralateralen Knochens wurde die Messung beendet.

Als Zielwerte wurden festgelegt:

- Drehmoment bei (erneutem) Bruch des Knochens (Holstein et al., 2007a)
- Maximaler Winkel vor (erneutem) Bruch des Knochens (Holstein et al., 2007a)
- Torsionssteifigkeit des Knochens (Holstein et al., 2007a)

Um individuelle Unterschiede in der Knochenqualität der einzelnen Tiere zu berücksichtigen, wurden die Ergebnisse der operierten Knochen in Relation zu den intakten kontralateralen Knochen gesetzt.

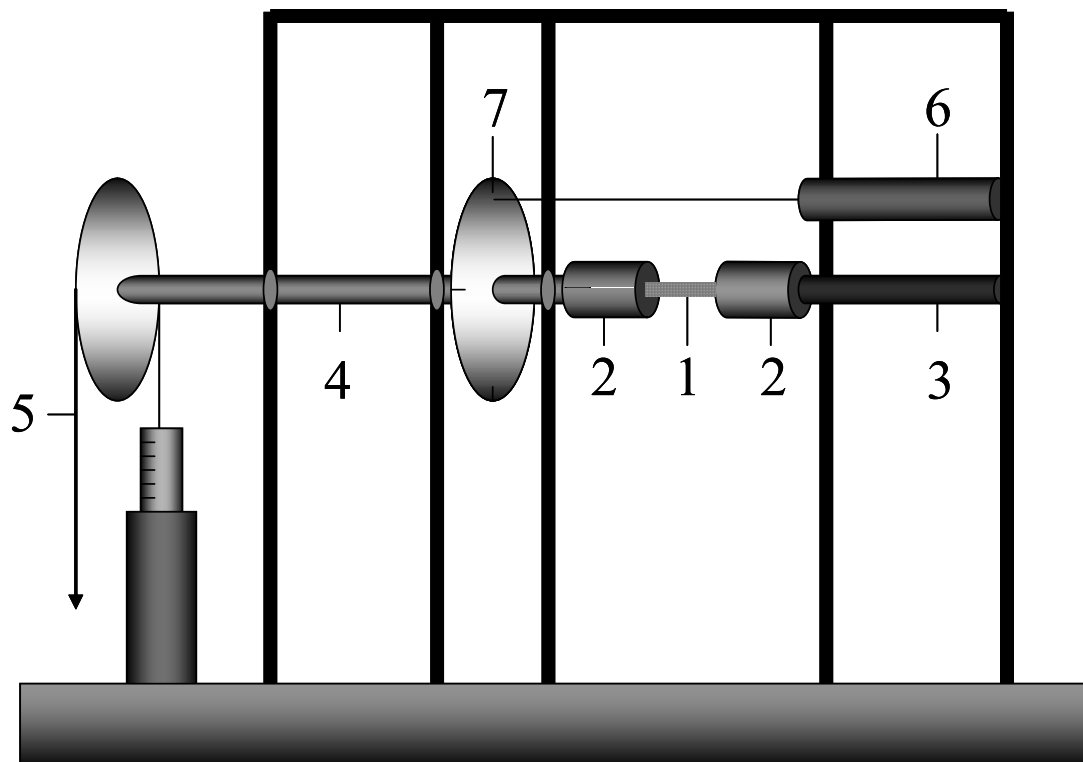


Abb. 19: Skizze der Rotationsmessapparatur: (1) einzementierter Knochen, (2) Einbettform, (3) fixe Achse, (4) rotierende Achse, (5) Drehmomentwaage, skaliert, (6) Laser zum Anzeigen des gemessenen Winkel, (7) Winkelscheibe, graduiert

### 3.2.3 Histomorphometrie

Die Histomorphometrie diente der quantitativen Analyse der Größe sowie der Gewebezusammensetzung des Kallus.

Nach Explantation und Präparation wurden die Femora für 24 Stunden in 4 % Formalin fixiert und für weitere 4 Wochen in 10 % Ethylendiaminotetraessigsäure (EDTA) bei 4 °C entkalkt. Die entkalkten Knochen wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (jeweils eine Stunde mit 70 %, 80 %, 90 %, sowie viermal eine Stunde mit 100 % Alkohol) entwässert. Im Anschluss wurden die Proben dreimal für jeweils eine Stunde mit Xylol behandelt, um das Gewebe paraffingängig zu machen. Abschließend wurden die Proben über den Zeitraum von einer Stunde in heißem Paraffin eingebettet.

Im weiteren Verlauf wurden 5 µm dicke Schnittpräparate im Bereich des maximalen Kallusdurchmessers in sagittaler longitudinaler Schnittführung angefertigt und nach der Masson-Goldner-Methode gefärbt. Hierzu wurden die Proben zunächst 1-2 Minuten in Weigert's Eisenhämatoxylin gefärbt, 10-15 Minuten unter fließendem Wasser gespült und anschließend weitere 5-7 Minuten in Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin gefärbt. Nach Spülung mit 1 % Essigsäure erfolgte die Behandlung mit Molybdatophosphorsäure-Orange bzw. Wolframtophosphorsäure-Orange bis zur völligen Entfärbung des Bindegewebes. Nach erneuter Spülung mit 1 % Essigsäure wurden die Präparate mit Lichtgrün für fünf Minuten gegengefärbt und abschließend mit 1 % Essigsäure für 5 Minuten ausgewaschen sowie in Isopropanol entwässert.

Unter 1,25-facher Vergrößerung (Olympus BX60 Microscope, Olympus, Tokio, Japan) wurden die histologischen Schnitte digitalisiert (Zeiss Axio Cam and Axio Vision 3.1, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) und mit Hilfe eines Bildauswertungsprogramms analysiert (ImageJ Analysis System, NIH, Bethesda, USA). Folgende Parameter wurden ausgewertet (Abb. 20):

- Femurdurchmesser in Höhe des Frakturspaltes [mm]
- Kallusfläche [mm<sup>2</sup>]
- Fläche des knorpeligen Anteils innerhalb des Kallus [mm<sup>2</sup>]
- Fläche des bindegewebigen Anteils innerhalb des Kallus [mm<sup>2</sup>]
- Fläche des knöchernen Anteils innerhalb des Kallus [mm<sup>2</sup>]

Als Zielwerte wurden gemäß den Empfehlungen der American Society of Bone and Mineral Research (ASBMR) (Parfitt et al., 1987) folgende Parameter berechnet:

- Kallusfläche / Femurdurchmesser (Cl.Ar/B.Dm [mm])
- Knöcherne Kallusfläche / Kallusfläche (B.Cl.Ar/Cl.Ar [mm])
- Knorpelige Kallusfläche / Kallusfläche (Cg.Cl.Ar/Cl.Ar [mm])
- Bindegewebige Kallusfläche / Kallusfläche (Fb.Cl.Ar/Cl.Ar [mm])

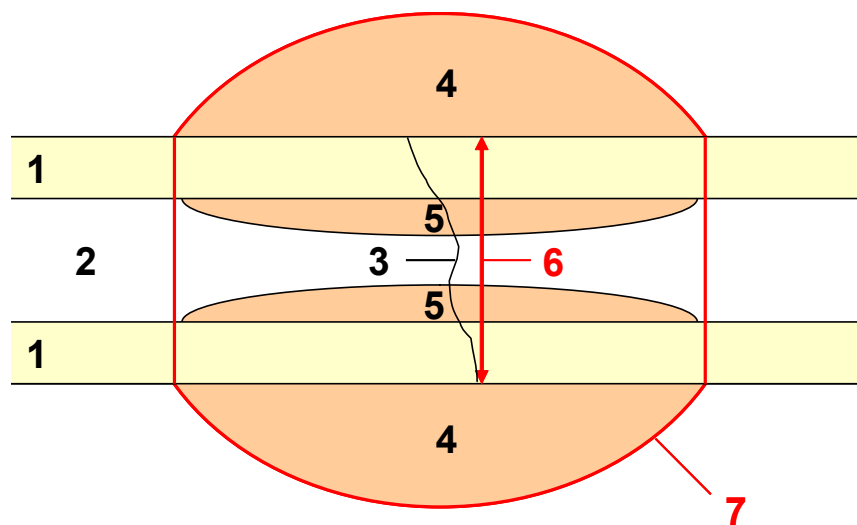


Abb. 20: Schematische Skizze der histologischen Auswertungsparameter innerhalb der Frakturzone (1) Kortikalis, (2) Markraum, (3) Frakturlinie, (4) Periostaler Kallus, (5) Endostaler Kallus, (6) Femurdurchmesser, (7) Gesamtkallus

### 3.2.4 Western Blot

Das Western- oder Immunoblotting dient als quantitative Messmethode der Ermittlung von Proteinexpressionen in entsprechenden Gewebeproben. Hierbei werden die extrahierten Proteine zunächst in einer vertikalen Gelmatrix durch ein elektrisches Feld aufgetrennt. Im Anschluss werden die resultierenden Proteinbanden in einer zweiten horizontalen Elektrophorese vom Gel auf eine proteinbindende Membran transferiert. Die spezifischen Targetproteine werden durch eine Färbung mit Enzym-konjugierten Antikörpern markiert und die Stärke der Proteinexpression über eine lichtemittierende Enzym-Substrat-Reaktion auf einem Röntgenfilm detektiert. Die gewonnen Proteinextrakte werden auf eine identische Proteinkonzentration eingestellt, um die Proteinexpression verschiedener Proben bei gleicher Beladung der Geltaschen und gleichmäßigem Gel-Membran-Transfer quantitativ zu vergleichen. Die Absicherung der Quantifizierbarkeit wird durch das „Mitführen“ eines ubiquitär konstitutiv exprimierten Proteins (i.d.R.  $\beta$ -Actin) gewährleistet. Entsprechend muss dieses Protein in allen zu vergleichenden Ansätzen die gleiche Expressionsstärke aufweisen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression des Proliferationsmarkers PCNA sowie des angiogenen und osteogenen Wachstumsfaktors VEGF mittels Western-Blot-Analyse nach

zweiwöchiger Frakturheilung quantifiziert. Vor Tötung der Tiere wurde hierzu der Weichteilmantel um die Femur-Diaphyse unter Narkose reseziert und der Kallus explantiert. Entsprechend bestanden die Kallusproben aus Knochen, Knorpel und Bindegewebe. Auf eine Analyse der Expression von PCNA und VEGF nach fünfwöchiger Frakturheilung wurde verzichtet, da in Vorversuchen gezeigt werden konnte, dass in dieser Phase der Frakturheilung keine relevante Expression der entsprechenden Proteine stattfindet (Holstein et al., 2007b).

Die kryokonservierten Proben (-80 °C) wurden zunächst mit je 150 µl vorgekühltem Lyse-Puffer, einem Proteaseinhibitor-Cocktail (1:75; Sigma, Taufkirchen, Deutschland) und 100 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, 1:75) im Handhomogenisator homogenisiert. Danach wurden die Proben für 30 Minuten auf Eis inkubiert und für weitere 30 Minuten mit 13000 U/min (16000 x g) bei 4 °C zentrifugiert (Biofuge Fresco, Kendro, Hanau, Deutschland). Abschließend wurden die Überstände abpipetiert und Aliquots der gewonnenen Proteinextrakte bei -20 °C kryokonserviert.

Die aus der Proteinextraktion gewonnenen Proben wurden mit destilliertem Wasser auf 1:10 verdünnt. Unmittelbar vor der Protein-Bestimmung wurde folgende Messlösung angesetzt:

- 5 ml Reagenz A: 10 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ /500 ml 0,1 M NaOH (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- 100 µl Reagenz B: 0,5 g KNa-Tartrat, 0,25 g Cu-Sulfat x 5  $\text{H}_2\text{O}$ /50 ml Aqua destillata (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Zu 250 µl dieser Lösung wurden je 50 µl der verdünnten Extrakte zugesetzt und 10 Sekunden gemischt (Vortex, Heidolph Reax Top, Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland). Im Anschluss wurden die Proben für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und mit 25 µl verdünnter Folinlösung (1:2 Aqua destillata) vermischt (Vortex).

Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption des entstandenen Farbkomplexes bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen Aqua destillata photometrisch gemessen (GeneQuant pro, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland). Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe einer bovine serum albumin (BSA)-Standardkurve ermittelt. Für jedes Proteinextrakt wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Extrakte

wurden auf gleiche Proteingehalte (13,5 µg/15 µl) eingestellt und mit Laemmli-Puffer (Sigma) (Laemmli, 1970) für 2 x 5 Minuten in kochendem Wasserbad denaturiert.

Die Western-Blot-Analysen wurden als eindimensionale SDS-Polyacryl-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unter diskontinuierlichen Bedingungen nach Laemmli (Laemmli, 1970) mit einer Acrylamidkonzentration von 5 % im Sammelgel und einer Acrylamidkonzentration von 10 % im Trenngel durchgeführt (30 % Acrylamid / Bis Solution, 29:1, BioRad, München, Deutschland, Tab. 2)

<b>Zusätze [ml]</b>	<b>Sammelgel 5 %</b>	<b>Trenngel 10 %</b>
30 % Acrylamid / Bis	0,67	3,3
Trenngelpuffer		2,5
Sammelgelpuffer	0,5	
A. dest	2,7	4,0
10 % SDS	0,04	0,1
10 % APS	0,04	0,1
TEMED	0,02	0,02

*Tab. 2: Zusammensetzung der für die Western-Blot-Analysen verwendeten Sammel- und Trenngele*

Die Gele wurden in einer vertikalen Flachapparatur mit Gießstand für Minigele (Mini-Protean II, BioRad) nach Anleitung des Herstellers gegossen. Damit eine Hemmung der Polymerisation an der Geloberfläche durch Sauerstoff verhindert wird, und die Ausbildung einer glatten Trennfläche zwischen Trenn- und Sammelgel gegeben ist, wurde nach dem Einfüllen der Trenngellösung etwa 200 µl Isopropanol (Roth) übergeschichtet. Nachdem das Gel eine Stunde polymerisiert und der Alkohol entfernt wurde, wurde das Sammelgel in die Elektrophoreseapparatur gegossen. Unmittelbar im Anschluss wurden die entsprechenden Geltaschen, die ein maximales Beladungsvolumen von 15 µl zulassen, mit einem Teflonkamm (15 Zähne, 4 mm x 1 cm x 0,75 mm, BioRad) gesetzt. Nach einer Stunde Polymerisierung wurden 15 µl der Proben in die Geltaschen aufgetragen. Im weiteren Verlauf wurde in einer vertikalen Elektrophoresekammer (Mini-Protean II, BioRad) die Trennung der



Proteine entsprechend ihrer Molekülgröße in einem TRIS / Glycinpuffer (0,125 M TRIS Base, 0,96 M Glycin, 0,5 % SDS, Roth) durchgeführt. Um die erforderliche Niederspannung zu gewährleisten, wurde ein spezielles Netzgerät für stabilisierten Gleichstrom (Power Pac, BioRad) verwendet. Hierbei wurde eine anfängliche Spannung von 100 V angelegt, um die Proteine im Sammelgel zu konzentrieren. Diese wurde nach 15 Minuten auf 140 V für etwa 1 Stunde zur Passage des Trenngels erhöht. Nachdem die „blaue Lauffront“ der Bromphenolblau-Bande des Sample Buffers das untere Gelende erreicht hatte, wurde die Auftrennung der Proteine beendet. Im Anschluss wurden die Gele aus der Kammer genommen und in einem Transferpufferbad (12 mM TRIS Base, 96 mM Glycin, Roth) für das weitere Membranblotting äquilibriert.

Zur Durchführung des so genannten Tankblottings im Rahmen des horizontalen Proteintransfers wurde eine Mini-Trans-Blotkammer (BioRad) verwendet. Um Oberflächenladungen auszugleichen, wurde die PVDF-Membran (0,2 µm Porengröße, BioRad) für 20 Sekunden in Methanol (Roth) gebadet und sofort mit destilliertem Wasser abgespült. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Äquilibration in Transferpuffer (12 mM TRIS Base, 96 mM Glycin in destilliertem Wasser). Für den Blotsandwich wurden die äquilibrierte PVDF-Membran und das Gel luftblasenfrei zwischen zwei Transferpuffergetränkte Schwämme mit entsprechendem Filterpapier (Whatman, Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland) in die Blotkassette eingelegt. Die verschlossene Sandwichkassette wurde so in der Blotkammer ausgerichtet, dass der Stromfluss einen Proteintransfer vom Gel zur Membran gewährleistete. Zur Beibehaltung einer gleichmäßig niedrigen Temperatur wurden ein so genannter Eis-Spacer und ein Magnetrührer verwendet. Nach Auffüllung der Blotkammer mit Transferpuffer wurde über 2 Stunden ein stabilisierender Gleichstrom (Anfangsstromstärke 800 mA / 2 Gele) bei konstanter Spannung (50 V) angelegt. Die proteinbeladene Membran wurde über Nacht in TBS-T-Puffer (1,5 mM TRIS Base pH 7,5, 1 % NaCl, 0,01 % Tween 20 (Roth) in destilliertem Wasser) bei 4 °C zur weiteren Bearbeitung aufbewahrt.

Die Detektion der Targetproteine erfolgte über eine spezifische Antikörperfärbung der membrantransferierten Proteine. Alle Handhabungen zur Antikörperfärbung der Membranen wurden auf einem Horizontalschüttler (Heidolph Polymax 1040, Fisher Scientific) durchgeführt. Die über Nacht in TBS-T aufbewahrten Membranen wurden vor der Saturierung noch dreimal mit TBS-T gewaschen. Die Membran wurde in fünfprozentiger

Lösung aus Milchpulver (Blotting Grade Blocker non-fat dry milk, BioRad) und TBS-T für 30 Minuten inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach drei weiteren Waschschritten mit TBS-T wurden die entsprechenden Primärantikörper für 180 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (Tab. 3).

<b>Antikörper</b>	<b>Klon Spezies</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Verdünnung Inkubation</b>
<b><i>PCNA</i></b>	PC-10	DAKO Cytomation	1:500
	Maus		3h RT
<b><i>VEGF</i></b>	C-1	Santa Cruz	1:100
	Maus		3h RT
<b><i>β-Actin</i></b>	AC-15	Sigma	1:5000
	Maus		3h RT

Tab. 3: Primärantikörper für die Western-Blot-Analysen

Nach drei weiteren Waschschritten mit TBS-T erfolgte die Sekundärantikörper-Inkubation (1:5000) mit HRP-konjugiertem Schaf-anti-Maus-IgG (Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark) bzw. Esel-anti-Kaninchen-IgG (Amersham Biosciences). Die Membranen wurden nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur fünfmal in TBS-T gewaschen und anschließend einer Chemilumineszenzreaktion unterzogen (ECL Western Blotting Analysis System, Amersham Biosciences).

Die entsprechenden Signale der behandelten Membranen wurden durch Exposition von Röntgenfilmen (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences) visualisiert. Als interner Standard wurde zur Kontrolle der Proteinbeladung und des Proteintransfers der monoklonale  $\beta$ -Actin-Antikörper Klon AC-15 (Sigma) verwendet. Als eines der höchst-konservierten eukaryotischen Proteine mit konstanter intrazellulärer Verteilung eignet sich  $\beta$ -Actin als Proteinkonzentrationsstandard. Konsekutiv wurde die densitometrisch ermittelte optische Dichte auf gleiche  $\beta$ -Actin-Konzentrationen korrigiert.

Die Röntgenfilme wurden mit einem Gel-Dokumentationssystem (Gel Doc, BioRad) und einem entsprechenden Quantifizierungsprogramm (Quantity One-Gel Doc, BioRad) ausgewertet. Die quantitative Analyse der Proteinmuster erfolgte durch densitometrische

Bestimmung der Lichtabsorption, indem die optische Dichte der Banden über die Fläche ihrer Ausdehnung analysiert wurde. Die ermittelten Daten wurden über den internen  $\beta$ -Actin-Standard korrigiert.

### **3.3. Statistik**

Alle statistischen Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Die Versuchsgruppen wurden mittels einseitigem ANOVA bzw. Student-Newman-Keuls-Test miteinander verglichen, so dass der Alpha-Fehler für Mehrfachvergleiche ausgeglichen wurde. Die Statistik wurde mit Hilfe des SigmaStat Software Package (Jandel, San Rafael, USA) durchgeführt. Es wurde ein P-Wert von  $< 0,05$  festgelegt, um signifikante Unterschiede anzuzeigen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Postoperativer Verlauf

Die Versuchstiere wurden unmittelbar vor der Operation sowie am Tötungstag gewogen. Das präoperative Körpergewicht diente als Grundlage für die Dosierung der Analgetika- und der Rapamycin-Applikation. Bei den Rapamycin-behandelten Tieren zeigte sich nach zweiwöchiger Standzeit im Mittel ein Gewichtsverlust von 3,7 g, nach einer Standzeit von fünf Wochen hingegen eine leichte Gewichtszunahme von 0,6 g gegenüber dem präoperativen Körpergewicht. Die Kontroll-Tiere wiesen im Mittel nach zwei Wochen eine Gewichtsabnahme von 0,5 g und nach fünf Wochen eine Gewichtszunahme von durchschnittlich 0,1 g auf (Abb. 21).

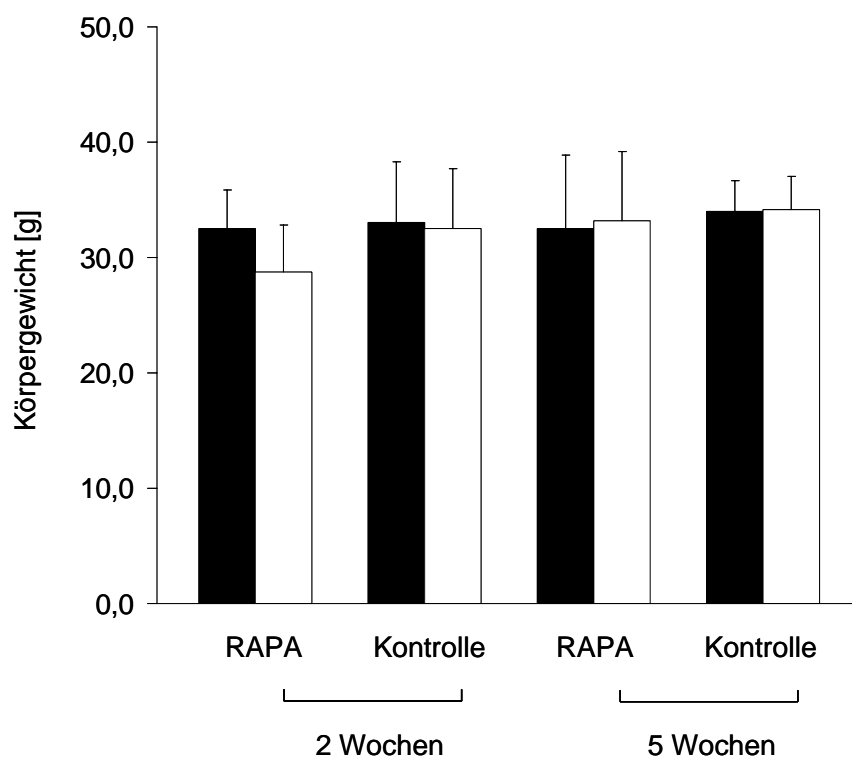


Abb. 21: Körpergewichte der Versuchstiere (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung) am Operationstag (schwarze Säulen) sowie am Tötungstag nach zwei bzw. fünf Wochen (weiße Säulen).

Als postoperative Ausschlusskriterien dienten ein nachgewiesener Knochen- oder Weichteilinfekt, eine Gewichtsabnahme von mehr als 20 % des Körpergewichtes sowie eine makroskopisch oder radiologisch erkennbare Implantatdislokation. Zudem wurden Tiere, in

denen keine Frakturkonfiguration Typ A2 oder A3 gemäß der AO/ASIF-Klassifikation (Koch et al., 1990) in Schaftmitte erzielt wurde von der Studie ausgeschlossen.

Im postoperativen Verlauf kam es nach etwa zwei Tagen zu einer Aufbelastung des frakturierten Beines. Die Tiere wiesen ein dem präoperativen Zustand vergleichbares physiologisches Verhalten auf ohne wesentliche erkennbare Beeinträchtigung des Bewegungsablaufes.

## **4.2 Makroskopie**

Alle Tiere wurden post mortem im Rahmen der Explantation der operierten Femora auf eventuelle Pathologien hin untersucht. Hierbei wurde ein besonderes Augenmerk auf die femoro-patellaren und femoro-tibialen Gelenkverhältnisse, die Beinmuskulatur sowie die Frakturlokalisation gelegt. Bei keinem der Tiere zeigten sich in diesem Zusammenhang Hinweise auf Patella- oder Kniegelenksluxationen, Infekte, Wundheilungsstörungen oder Muskelatrophien. Des Weiteren wurden bei jedem Präparat die korrekte Lage des Marknagels und dessen fester Sitz überprüft. Alle in die Studie eingeschlossenen Tiere wiesen makroskopisch eine stattgehabte middiaphysäre Femurschaftfraktur auf.

Nach Resektion des Weichteilmantels wurde die Überbauung des Frakturspaltes begutachtet. Hierbei zeigte sich nach zweiwöchiger Standzeit in den Rapamycin-behandelten Tieren eine deutlich verminderte Kallusformation verglichen mit den Kontroll-Tieren. Hinsichtlich der Kallusqualität schien nach zweiwöchiger Frakturheilung der Anteil von weichem Kallus in Rapamycin-behandelten Tieren ausgeprägter zu sein als in den entsprechenden Kontrollen. Nach fünfwöchiger Frakturheilung zeigten sich makroskopisch keine erkennbaren Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen im Hinblick auf die Kallusgröße sowie die Kallusbeschaffenheit.

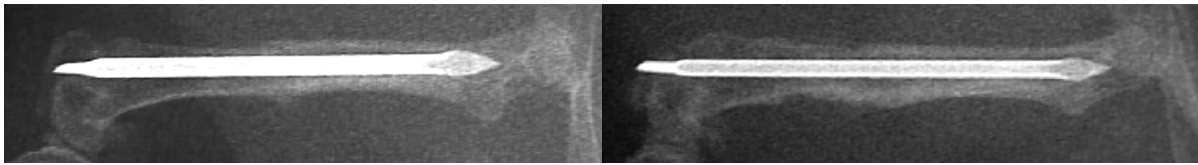
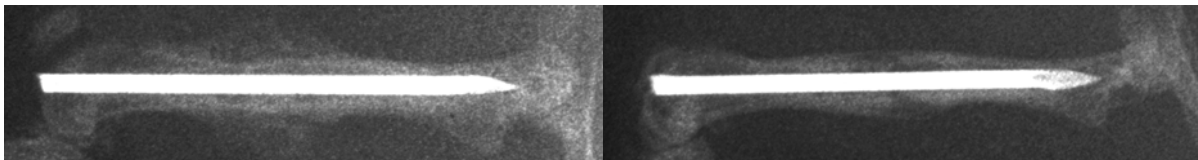
## **4.3 Radiologie**

Die radiologische Auswertung der Knochenbruchheilung erfolgte anhand der Röntgenbilder, die jeweils nach zwei- und fünfwöchiger Frakturheilung angefertigt wurden. Zur Auswertung

kamen der radiologische Kallus- und Femurdurchmesser sowie die Fläche des periostalen Kallus und des gesamten Femurs.

Nach zweiwöchiger Frakturheilung zeigte sich ein Kallusdurchmesser von 1,4 mm bis 2,5 mm in der Rapamycin-Gruppe und von 3,0 mm bis 4,5 mm in der Kontroll-Gruppe. Der entsprechende Mittelwert (M) betrug in der Rapamycin-Gruppe 1,7 mm bei einer Standardabweichung (SD) von 0,3 mm und in der Kontroll-Gruppe 3,4 mm bei einer Standardabweichung von 0,4 mm. Demzufolge wiesen die Rapamycin-behandelten Tiere im Vergleich zu den Kontroll-Tieren nach zweiwöchiger Frakturheilung einen signifikant niedrigeren Kallusdurchmesser auf ( $p < 0,05$ ). Nach fünf Wochen glichen sich die Kallusdurchmesser zwischen den beiden Versuchsgruppen an. Hierbei ergab sich ein Durchmesser von 1,7 mm bis 3,4 mm in der Rapamycin-Gruppe sowie von 1,7 mm bis 5,3 mm in der Kontroll-Gruppe. Die resultierenden Mittelwerte ( $2,4 \pm 0,4$  mm in Rapamycin-behandelten Tieren,  $2,6 \pm 0,8$  mm in Kontrollen) wiesen folglich keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen auf ( $p > 0,05$ , Abb. 22).

Zwei Wochen nach Frakturierung ergab auch die quantitative Auswertung der periostalen Kallusfläche signifikant verminderte Werte nach Rapamycin-Behandlung ( $0,0 \text{ mm}^2$  bis  $0,7 \text{ mm}^2$ ,  $M = 0,1 \pm 0,2 \text{ mm}^2$ ) im Vergleich zu unbehandelten Kontroll-Tieren ( $3,2 \text{ mm}^2$  bis  $10,7 \text{ mm}^2$ ,  $M = 5,3 \pm 1,9 \text{ mm}^2$ ,  $p < 0,05$ ). Nach fünfwöchiger Frakturheilung zeigte sich hingegen eine vergleichbare periostale Kallusfläche ohne signifikante Unterschiede zwischen beiden Versuchsgruppen ( $0,0 \text{ mm}^2$  bis  $4,2 \text{ mm}^2$ ,  $M = 1,8 \pm 1,1 \text{ mm}^2$  in der Rapamycin-Gruppe,  $0,0 \text{ mm}^2$  bis  $3,9 \text{ mm}^2$ ,  $M = 1,9 \pm 1,4 \text{ mm}^2$  in der Kontroll-Gruppe,  $p > 0,05$ , Abb. 22).

**RAPA****Kontrolle****2 Wochen****5 Wochen**

*Abb. 22: Röntgenaufnahme der Femora von Rapamycin-behandelten Tieren (obere Reihe) sowie von unbehandelten Kontroll-Tieren (untere Reihe) nach zweiwöchiger (linke Bildhälfte), bzw. fünfwöchiger (rechte Bildhälfte) Frakturheilung. Während nach zwei Wochen in dem Kontrolltier eine ausgeprägte Kalluswolke erkennbar ist, weist das Rapamycin-behandelte Tier zu diesem Zeitpunkt keine Kallusformation auf. Im Gegensatz dazu zeigen nach fünf Wochen beide abgebildeten Versuchstiere eine knöcherne Überbrückung des Frakturspalt es ohne signifikante Unterschiede hinsichtlich der Kallusausprägung.*

Um individuelle anatomische Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchstieren zu berücksichtigen, wurde der gemessene Kallusdurchmesser zusätzlich in Relation zum Femurdurchmesser und die gemessene periostale Kallusfläche in Relation zur Gesamtfläche des Femurs quantifiziert. Hierbei ließen sich oben erhobene Ergebnisse bestätigen, so dass sich nach zwei Wochen ein signifikant geringerer relativer Kallusdurchmesser in der Rapamycin-Gruppe (102 % bis 190 %,  $M = 122 \pm 20$  %) verglichen mit dem der Kontroll-Gruppe (198 % bis 281 %,  $M = 231 \pm 24$  %) zeigte. Der verminderte relative Kallusdurchmesser nach zwei Wochen korrelierte mit einer minimalen relativen periostalen Kallusfläche nach Rapamycin-Behandlung (0 %), während die relative periostale Kallusfläche in den entsprechenden Kontroll-Tieren 10 % bis zu 28 % betrug ( $M = 17 \pm 5$  %,  $p < 0,05$ ). Nach fünf Wochen konnten keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf den relativen Femurdurchmesser (122 % bis 254 %,  $M = 164 \pm 40$  % nach Rapamycin-Behandlung, 112 % bis 356 %,  $M = 170 \pm 56$  % in Kontrollen,  $p > 0,05$ ), sowie die relative periostale Kallusfläche (0 % bis 16 %,  $M = 7 \pm 4$  % nach Rapamycin-Behandlung, 0 % bis 14 %,  $M = 7 \pm 5$  % in Kontrollen,  $p > 0,05$ ) festgestellt werden (Abb. 22- 24).

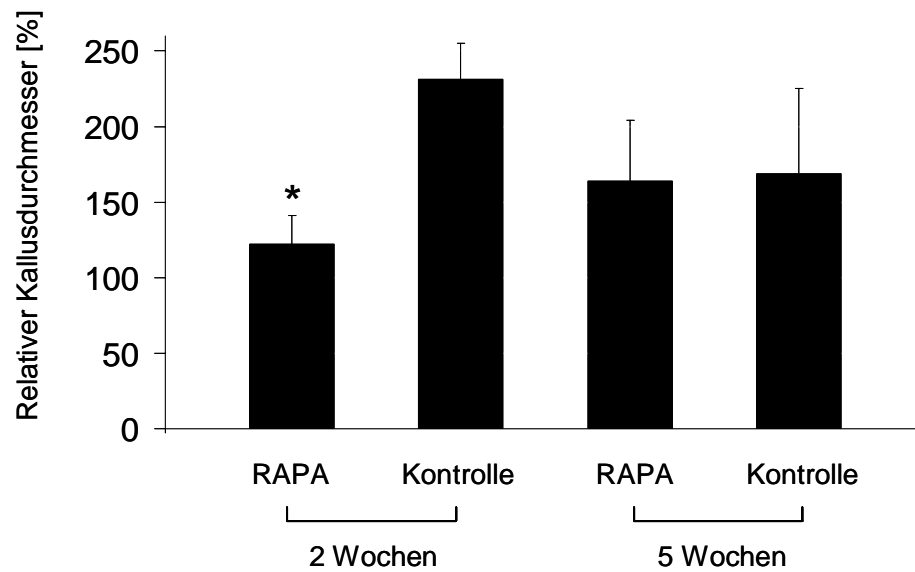


Abb. 23: Radiologischer Kallusdurchmesser in Relation zum Femurdurchmesser. Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben (\* $p < 0,05$  versus der entsprechenden Kontroll-Gruppe).

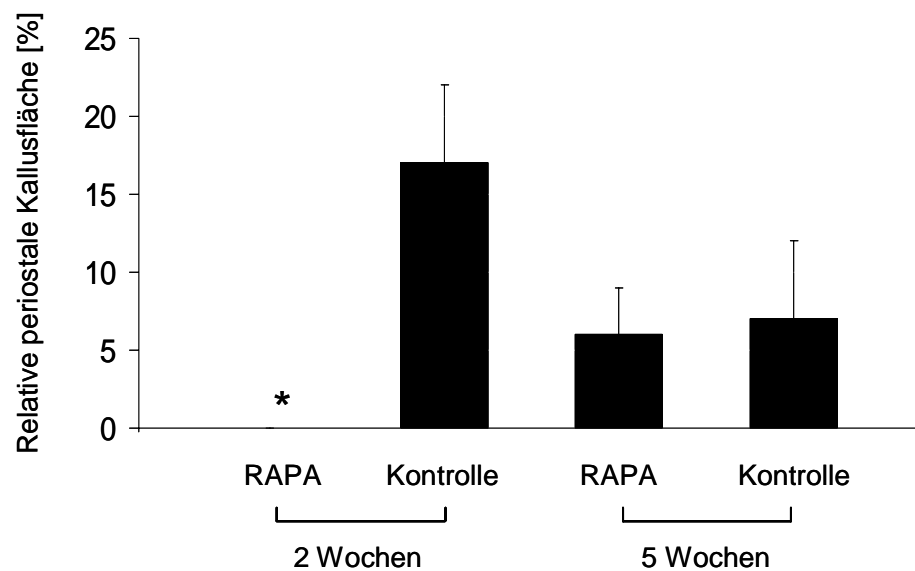


Abb. 24: Radiologische periostale Kallusfläche in Relation zur gesamten Femurfläche. Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben (\* $p < 0,05$  versus der entsprechenden Kontroll-Gruppe).



## 4.4 Biomechanik

Die biomechanische Stabilität der verheilten Fraktur wurde durch eine Rotationstestung quantifiziert. Um individuelle Unterschiede in der Größe und Beschaffenheit der Knochen zwischen den einzelnen Versuchstieren zu berücksichtigen, wurde die Rotationstestung sowohl am frakturierten rechten Femur als auch an der unfrakturierten linken Gegenseite durchgeführt. Die Messwerte der rechten Seite wurden konsekutiv in Relation zur entsprechenden linken Gegenseite dargestellt.

Die Rotationstestung der unfrakturierten Femora ergab ein maximales Drehmoment bei Zerstörung des Knochens von 27,5 Nmm bis 52,5 Nmm, die frakturierten Femora wiesen ein maximales Drehmoment von 5,0 Nmm bis 17,5 Nmm nach zweiwöchiger Frakturheilung sowie von 12,5 Nmm bis 37,5 Nmm nach fünfwöchiger Frakturheilung auf. Nach zweiwöchiger Frakturheilung unter täglicher Rapamycin-Applikation zeigte sich ein vermindertes maximales Drehmoment ( $M = 7,8 \pm 2,0$  Nmm) im Vergleich zu den entsprechenden unbehandelten Kontrollen ( $M = 11,6 \pm 2,8$  Nmm,  $p < 0,05$ ). Korrespondierend zu den Ergebnissen der radiologischen Untersuchungen glich sich das maximale Drehmoment nach fünf Wochen zwischen den beiden Versuchsgruppen an, so dass zu diesem Zeitpunkt keine signifikanten Unterschiede erkennbar waren ( $24,1 \pm 8,6$  Nmm in Rapamycin-behandelten Tieren,  $23,4 \pm 4,8$  Nmm in Kontrollen,  $p > 0,05$ ).

Die biomechanische Analyse des maximalen Torsionswinkels bei Zerstörung der Knochen ergab Werte von  $4,5^\circ$  bis  $14^\circ$  in unfrakturierten Knochen sowie von  $6,0^\circ$  bis  $28,5^\circ$  in Knochen nach zweiwöchiger, bzw. von  $2^\circ$  bis  $8,5^\circ$  in Knochen nach fünfwöchiger Frakturheilung. Die statistische Analyse der Messwerte zeigte einen deutlich höheren maximalen Torsionswinkel nach zweiwöchiger Frakturheilung unter Rapamycin-Behandlung im Vergleich zu den entsprechenden Kontroll-Tieren ( $18,2 \pm 9,4^\circ$  versus  $9,2 \pm 3,5^\circ$ ,  $p < 0,05$ ). Im Gegensatz dazu waren auch für diesen Messparameter keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen nach fünfwöchiger Frakturheilung erkennbar ( $4,1 \pm 1,1^\circ$  in Rapamycin-behandelten Tieren versus  $5,4 \pm 1,8^\circ$  in Kontrollen,  $p > 0,05$ ).

Die Rotationstestung der unfrakturierten Femora ergab eine maximale Torsionssteifigkeit bei Zerstörung des Knochens von  $2,7$  Nmm/ $^\circ$  bis  $6,7$  Nmm/ $^\circ$ . Die frakturierten Femora wiesen

eine maximale Torsionssteifigkeit von 0,2 Nmm/° bis 2,1 Nmm/° nach zweiwöchiger Frakturheilung sowie von 2,8 Nmm/° bis 7,5 Nmm/° nach fünfwöchiger Frakturheilung auf. Unter Rapamycin-Behandlung zeigten die Femora nach zweiwöchiger Frakturheilung eine deutlich verringerte maximale Torsionssteifigkeit ( $M = 0,6 \pm 0,3$  Nmm/°) gegenüber den Femora ohne Rapamycin-Behandlung ( $M = 1,4 \pm 0,5$  Nmm/°,  $p < 0,05$ ). In Übereinstimmung zu den anderen biomechanischen Ergebnissen konnten auch für die Torsionssteifigkeit nach fünf Wochen keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Versuchsgruppen festgestellt werden ( $5,0 \pm 1,2$  Nmm/° in Rapamycin-behandelten Tieren,  $4,6 \pm 1,3$  Nmm/° in Kontrollen,  $p > 0,05$ ).

Um eventuelle Differenzen in Beschaffenheit und Größe der einzelnen Femora zu berücksichtigen, wurden die Ergebnisse in Relation zum entsprechenden unfrakturierten Femur quantifiziert. Hierbei konnte für das maximale relative Drehmoment nach zweiwöchiger Frakturheilung ein geringer, allerdings nicht signifikanter Unterschied zwischen Rapamycin-Gruppe (11 % bis 36 %,  $M = 20 \pm 8$  %) und Kontroll-Gruppe (19 % bis 36 %,  $M = 25 \pm 6$  %,  $p > 0,05$ ) festgestellt werden. Jedoch zeigte sich in der Rapamycin-Gruppe ein signifikant höherer relativer Torsionswinkels bei Zerstörung der Knochen gegenüber der Kontroll-Gruppe (93 % bis 622 %,  $M = 254 \pm 159$  % versus 62 % bis 193 %,  $M = 110 \pm 55$  %,  $p < 0,05$ ). Korrespondierend dazu ergab sich eine signifikant verringerte relative Torsionssteifigkeit in Tieren unter Rapamycin-Behandlung gegenüber den unbehandelten Kontroll-Tieren (3 % bis 23 %,  $M = 12 \pm 6$  % versus 10 % bis 54 %,  $M = 28 \pm 14$  %,  $p < 0,05$ ).

Die Quantifizierung des maximalen relativen Drehmomentes und Winkels bei Zerstörung der Knochen sowie der relativen Torsionssteifigkeit nach fünfwöchiger Frakturheilung zeigte wiederum keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen (relatives Drehmoment: 31 % bis 88 %,  $M = 63 \pm 19$  % in der Rapamycin-Gruppe versus 39 % bis 69 %,  $M = 55 \pm 12$  % in der Kontroll-Gruppe,  $p > 0,05$ ; relativer Winkel: 40 % bis 80 %,  $M = 52 \pm 17$  % in der Rapamycin-Gruppe versus 39 % bis 84 %,  $M = 59 \pm 14$  % in der Kontroll-Gruppe,  $p > 0,05$ ; relative Torsionssteifigkeit: 67 % bis 375 %,  $M = 142 \pm 92$  % in der Rapamycin-Gruppe versus 60 % bis 110 %,  $M = 95 \pm 15$  % in der Kontroll-Gruppe,  $p > 0,05$ ) (Abb. 25).

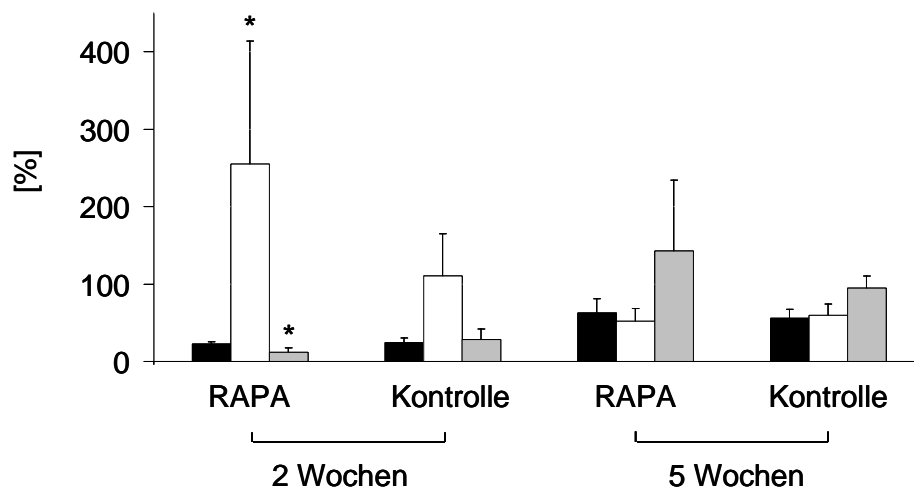


Abb. 25: Maximales Drehmoment (schwarze Säulen) und maximaler Rotationswinkel (weiße Säulen) bei Zerstörung des Knochens sowie Torsionssteifigkeit (graue Säulen) des frakturierten rechten Femurs in Relation zu den entsprechenden Werten der unfrakturierten Gegenseite. Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben (\* $p < 0,05$  versus der entsprechenden Kontroll-Gruppe).

## 4.5 Histologie

Die histomorphometrische Auswertung des Frakturkallus erfolgte am sagittalen longitudinalen Schnittpräparat im Bereich des maximalen Kallusdurchmessers (entsprechend des maximalen Femurdurchmessers).

Die quantitative Analyse der histologischen Gesamt-Kallusfläche ergab nach zweiwöchiger Frakturheilung signifikant verminderte Werte unter Rapamycin-Behandlung (2,9 mm<sup>2</sup> bis 12,9 mm<sup>2</sup>,  $M = 8,3 \pm 3,7$  mm<sup>2</sup>) gegenüber Tieren ohne entsprechende Behandlung (9,1 mm<sup>2</sup> bis 16,3 mm<sup>2</sup>,  $M = 12,0 \pm 2,4$  mm<sup>2</sup>,  $p < 0,05$ ). Nach fünf Wochen zeigte sich eine vergleichbare Gesamt-Kallusfläche von 8,5 mm<sup>2</sup> bis 17,4 mm<sup>2</sup> ( $M = 12,5 \pm 3,2$  mm<sup>2</sup>) in Rapamycin-behandelten Tieren sowie von 3,3 mm<sup>2</sup> bis 18,0 mm<sup>2</sup> ( $M = 9,6 \pm 4,3$  mm<sup>2</sup>,  $p > 0,05$ ) in unbehandelten Kontroll-Tieren (Abb. 26).

Um eventuellen Differenzen in der Femurgröße zwischen den einzelnen Versuchstieren Rechnung zu tragen, wurde die Kallusfläche zusätzlich in Relation zu dem jeweiligen Femurdurchmesser im Frakturbereich quantifiziert. Auch im Rahmen dieser Messmethode

wiesen die Rapamycin-behandelten Tiere nach zweiwöchiger Frakturheilung eine signifikant geringere relative Kallusfläche im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen auf (2,2 mm bis 7,9 mm,  $M = 5,4 \pm 1,9$  mm versus 5,6 mm bis 10,7 mm,  $M = 8,0 \pm 1,5$  mm,  $p < 0,05$ ), während sich die relative Kallusfläche nach fünf Wochen zwischen beiden Versuchsgruppen anglich (5,0 mm bis 12,8 mm,  $M = 7,0 \pm 2,7$  mm in Rapamycin-behandelten Tieren versus 2,3 mm bis 7,9 mm,  $M = 5,8 \pm 1,9$  mm in unbehandelten Kontrollen,  $p > 0,05$ ) (Abb. 26-27).

Die Differenzierung der Gewebe-Zusammensetzung innerhalb des Frakturkallus zeigte nach zwei Wochen in der Rapamycin-Gruppe eine signifikant geringere Fläche an Knochen (0,8 mm<sup>2</sup> bis 4,8 mm<sup>2</sup>,  $M = 2,4 \pm 1,2$  mm<sup>2</sup>) verglichen mit der entsprechenden Kontroll-Gruppe (4,2 mm<sup>2</sup> bis 8,9 mm<sup>2</sup>,  $M = 6,0 \pm 1,5$  mm<sup>2</sup>,  $p < 0,05$ ). Im Gegensatz dazu waren zu diesem Zeitpunkt keine signifikanten Unterschiede in der Fläche an Knorpel und Bindegewebe zwischen Rapamycin-behandelten Tieren und Kontrollen zu erkennen (Knorpel: 0,0 mm<sup>2</sup> bis 1,6 mm<sup>2</sup>,  $M = 0,9 \pm 0,6$  mm<sup>2</sup> in Rapamycin-behandelten Tieren versus 0,0 mm<sup>2</sup> bis 1,4 mm<sup>2</sup>,  $M = 0,5 \pm 0,4$  mm<sup>2</sup> in Kontrollen; Bindegewebe: 0,1 mm<sup>2</sup> bis 1,6 mm<sup>2</sup>,  $M = 0,7 \pm 0,5$  mm<sup>2</sup> in Rapamycin-behandelten Tieren versus 0,0 mm<sup>2</sup> bis 2,7 mm<sup>2</sup>,  $M = 0,4 \pm 0,9$  mm<sup>2</sup> in Kontrollen,  $p > 0,05$ ). Nach fünfwöchiger Frakturheilung zeigten nahezu alle Versuchstiere beider Gruppen eine knöcherne Frakturüberbauung (Knochenfläche: 2,3 mm<sup>2</sup> bis 13,0 mm<sup>2</sup>,  $M = 6,6 \pm 3,5$  mm<sup>2</sup> in Rapamycin-behandelten Tieren versus 2,2 mm<sup>2</sup> bis 12,0 mm<sup>2</sup>,  $M = 6,5 \pm 2,9$  mm<sup>2</sup> in Kontrollen,  $p > 0,05$ ) mit nur minimalem Knorpelanteil (0,0 mm<sup>2</sup> bis 1,4 mm<sup>2</sup>,  $M = 0,2 \pm 0,5$  mm<sup>2</sup> in Rapamycin-behandelten Tieren versus 0,0 mm<sup>2</sup>,  $M = 0,0 \pm 0,0$  mm<sup>2</sup> in Kontrollen,  $p > 0,05$ ) und Bindegewebsanteil (0,0 mm<sup>2</sup>,  $M = 0,0 \pm 0,0$  mm<sup>2</sup> in Rapamycin-behandelten Tieren versus 0,0 mm<sup>2</sup>,  $M = 0,0 \pm 0,0$  mm<sup>2</sup> in Kontrollen,  $p > 0,05$ ) am Frakturkallus (Abb. 26).

In der Analyse des prozentualen Gewebe-Anteils am Gesamtkallus ließen sich diese Ergebnisse reproduzieren. Entsprechend führte die Rapamycin-Behandlung nach zwei Wochen im Vergleich zu unbehandelten Kontroll-Tieren zu einem signifikant verminderten prozentualen Anteil an Knochen innerhalb des Frakturkallus (21 % bis 38 %,  $M = 29 \pm 5$  % versus 37 % bis 64 %,  $M = 50 \pm 10$  %,  $p < 0,05$ ), während keine signifikanten Unterschiede im prozentualen Anteil an Knorpel (1 % bis 22 %,  $M = 9 \pm 6$  % in Rapamycin-behandelten Tieren versus 0 % bis 13 %,  $M = 5 \pm 4$  % in Kontrollen,  $p > 0,05$ ) und Bindegewebe (3 % bis 15 %,  $M = 9 \pm 5$  % in Rapamycin-behandelten Tieren versus 0 % bis 24 %,  $M = 4 \pm 8$  % in Kontrollen,  $p > 0,05$ ) zwischen den Gruppen ersichtlich waren. Nach fünfwöchiger

Frakturheilung war auch im Rahmen der Analyse des prozentualen Gewebe-Anteils am Gesamtkallus innerhalb des Frakturkallus in beiden Versuchsgruppen fast ausschließlich Knochen (21 % bis 75 %,  $M = 50 \pm 15$  % in Rapamycin-behandelten Tieren versus 41 % bis 80 %,  $M = 72 \pm 28$  % in Kontrollen) und nahezu kein Knorpel (0 % bis 13 %,  $M = 2 \pm 4$  % in Rapamycin-behandelten Tieren versus 0 %,  $M = 0 \pm 0$  % in Kontrollen,  $p > 0,05$ ) und Bindegewebe (0 %,  $M = 0 \pm 0$  % in Rapamycin-behandelten Tieren versus 0 %,  $M = 0 \pm 0$  % in Kontrollen,  $p > 0,05$ ) nachweisbar (Abb. 26+28).

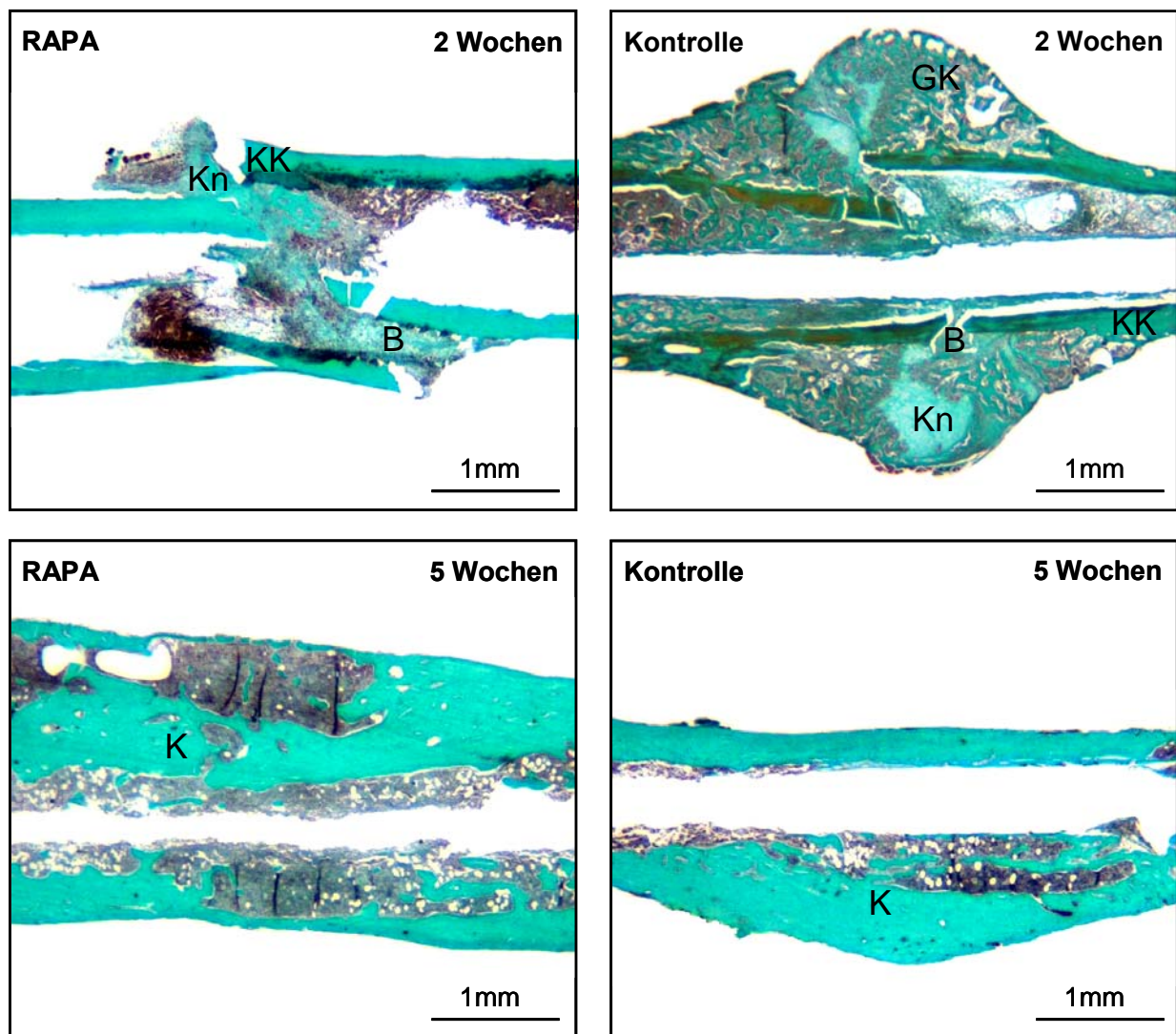


Abb. 26: Sagittale longitudinale histologische Femur-Schnittpräparate im Bereich des maximalen Kallusdurchmessers. Nach zweiwöchiger Frakturheilung unter täglicher Rapamycin-Behandlung (linke obere Abbildung) zeigt sich nur eine minimale Kallusformation, während zu diesem Zeitpunkt in dem entsprechenden Kontroll-Tier (rechte obere Abbildung) eine ausgeprägte Kallusreaktion mit dem typischen Bild einer enchondralen Ossifikation zu erkennen ist (KK: Kortikaler Knochen, GK: Geflechtknochen, Kn: Knorpel, B: Bindegewebe). Nach fünf Wochen findet sich sowohl unter Rapamycin-Behandlung (linke untere Abbildung) als auch ohne entsprechende Behandlung (rechte untere Abbildung) eine komplette Überbauung des Frakturspalt mit Knochen (K), der zu diesem Zeitpunkt einem intensiven Remodeling unterliegt. Entsprechend ist in dieser Phase der Frakturheilung eine Unterscheidung zwischen neuem Geflechtknochen (GK) und altem kortikalem Knochen (KK) nicht mehr möglich.

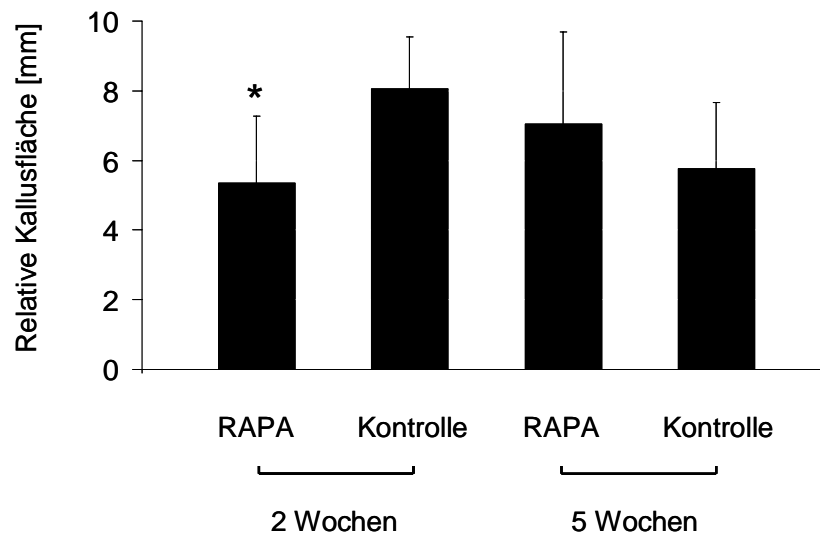


Abb. 27: Histologische Kallusfläche in Relation zum Femurdurchmesser. Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben (\* $p < 0,05$  versus der entsprechenden Kontroll-Gruppe).

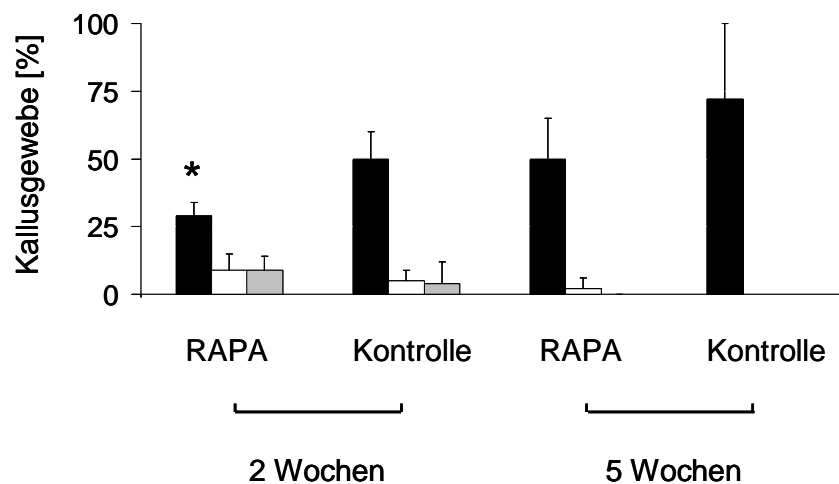


Abb. 28: Histologische Gewebe-Zusammensetzung des Frakturkallus aus Knochen (schwarze Säulen), Knorpel (weiße Säulen) und Bindegewebe (graue Säulen). Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben (\* $p < 0,05$  versus der entsprechenden Kontroll-Gruppe).

## 4.6 Western Blot

In der Western-Blot-Analyse ließen sich nach zweiwöchiger Frakturheilung in allen Proben charakteristische Banden entsprechend des Molekulargewichtes des Proliferationsmarkers PCNA sowie des angiogenen und osteogenen Wachstumsfaktors VEGF nachweisen.

Die densitometrische Auswertung des Western Blot ergab unter Rapamycin-Behandlung eine signifikant niedrigere Expression von PCNA ( $9,2 \pm 2,6 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$ ) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen ( $16,3 \pm 2,3 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$ ,  $p < 0,05$ ) (Abb.29- 30).

Die quantitative Analyse der Expression von VEGF zeigte ebenfalls eine signifikant verminderte Signalgebung in Rapamycin-behandelten Tieren ( $5,7 \pm 1,3 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$ ) verglichen mit den entsprechenden Kontroll-Tieren ( $13,7 \pm 1,8 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$ ) (Abb.29+31).

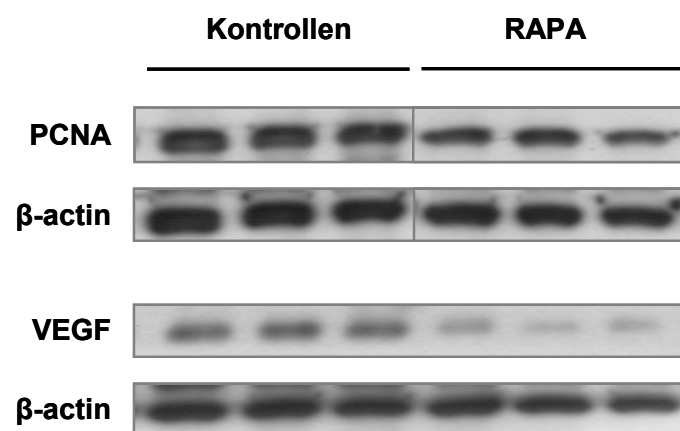


Abb. 29: Western-Blot-Analyse der Expression des Proliferationsmarkers PCNA sowie Wachstumsfaktors VEGF nach zweiwöchiger Frakturheilung.  $\beta$ -Actin diente als Proteinkonzentrationsstandard.



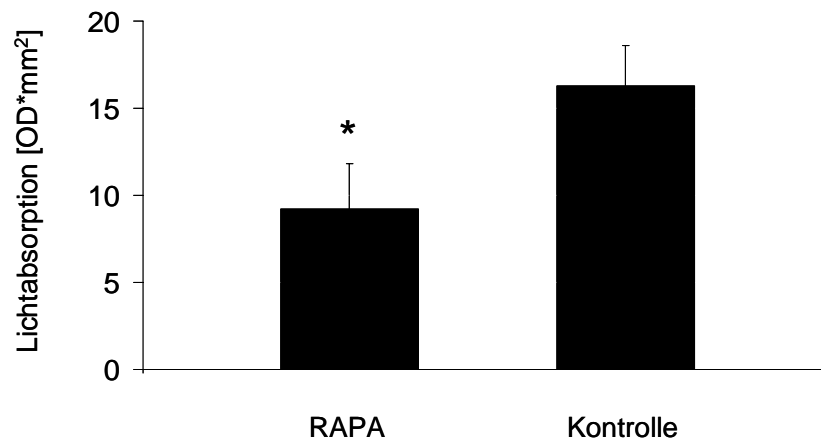


Abb. 30: Quantitative Analyse der Expression des Proliferationsmarkers PCNA im Western Blot. Die densitometrisch ermittelte optische Dichte wurde auf gleiche  $\beta$ -Actin-Konzentrationen korrigiert. Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben (\* $p < 0,05$  versus der entsprechenden Kontroll-Gruppe).

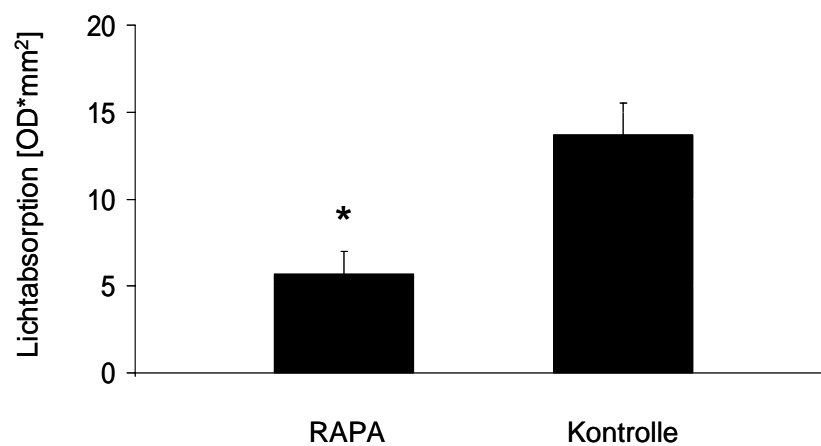


Abb. 31: Quantitative Analyse der Expression des Wachstumsfaktors VEGF im Western Blot. Die densitometrisch ermittelte optische Dichte wurde auf gleiche  $\beta$ -Actin-Konzentrationen korrigiert. Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben (\* $p < 0,05$  versus der entsprechenden Kontroll-Gruppe).

## 5 Diskussion

### 5.1 Diskussion der Methoden

Die Knochenheilung stellt einen komplexen biologischen Prozess dar, der die Interaktion zahlreicher knochenfremder Gewebetypen, wie etwa des periostären Weichteilgewebes, des Periosts oder des Gefäßsystems erfordert. Aufgrund des komplexen örtlichen und zeitlichen Zusammenspiels der verschiedenen Phasen der Frakturheilung und aufgrund der schlechten Reproduzierbarkeit des ossären „micro-environments“ sind in-vitro-Untersuchungen zur Knochenbruchheilung nur sehr begrenzt aussagekräftig (Friedman et al., 1996). Daher wurde der Einfluss von Rapamycin auf die Frakturheilung im Tiermodell untersucht.

Die Maus besitzt im Gegensatz zum Menschen kein Havers-System. Dies kann durchaus als Nachteil für die Übertragbarkeit von Ergebnissen aus Studien an der Maus auf den Menschen angesehen werden. Dennoch weist die Ausbildung so genannter Resorptionshöhlen im Rahmen der Frakturheilung an der Maus Analoga mit dem Remodeling über das Havers-System auf (Nunamaker, 1998). Des Weiteren haben wir uns für die Durchführung der Studie an der Maus aufgrund der relativ geringen Haltungs- und Zuchtkosten und somit einer guten Realisierbarkeit großer Gruppenstärken entschieden. Zusätzlich ist von Vorteil, dass das Genom der Maus bereits in seiner Gesamtheit entschlüsselt ist und folgend auch für keine andere Spezies ein derart großes Spektrum transgener Stämme sowie spezifischer Antikörper verfügbar ist (Rossant & Nagy, 1995). Bereits zuvor wurde von unserer Arbeitsgruppe daher ein leicht reproduzierbares Mausmodell entwickelt (Holstein et al., 2007a), was für Folgeversuche beispielsweise an Knock-Out-Tieren herangezogen werden kann.

Das verwendete Tiermodell ist bereits publiziert (Holstein et al., 2007a) und in vorangegangenen Studien erfolgreich angewendet worden (Holstein et al., 2007b). Das Modell wurde als Modifikation herkömmlicher Pin-Osteosynthese-Modelle entwickelt (Bourque et al., 1992; Hiltunen et al., 1993b; Manigrasso & O'Connor, 2004; Street et al., 2002). Die Vorteile von Frakturmodellen mit intramedullärer Pin-Osteosynthese liegen in dem relativ einfachen und kleinen Zugangsweg (parapatellare Hautinzision in einer Länge von etwa 4 mm), so dass die geschlossene Frakturierung und Implantateinbringung im Vergleich zu offenen Frakturmodellen nur einen minimalen Weichteilschaden verursacht. Da die mechanischen Gegebenheiten im Frakturspalt einen enormen Einfluss auf die

Knochenbruchheilung haben (Claes et al., 1998), sind die Ergebnisse von Studien mit instabiler Pin-Osteosynthese nur begrenzt aussagekräftig. Um das „mechanical environment“ innerhalb des Frakturspaltes zu standardisieren, entwickelte unsere Arbeitsgruppe daher erstmals ein geschlossenes rotationsstabiles Osteosyntheseverfahren für das Mäusefemur. Durch das hier angewendete Verriegelungsmarknagel-Modell gelang uns eine Frakturstabilisierung, durch die sich die biomechanischen Einflussfaktoren auf die Frakturheilung weitgehend standardisieren lassen. Neben dem beschriebenen Verriegelungsmarknagel-Modell gewährleistet bis dato an der Maus nur der Fixateur externe eine suffiziente Rotationsstabilität (Cheung et al., 2003). Die Nachteile dieses Modells liegen in dem hohen Implantatgewicht mit konsekutiver Behinderung des normalen Bewegungsablaufes der Maus und in einer anspruchsvollen und aufwendigen Operationstechnik. Da die Pins offen eingebracht werden müssen, besitzt dieses Verfahren eine deutlich höhere Invasivität als die Marknagelung. Zudem haben kleine Materialunterschiede des Fixateurs große Auswirkungen auf die Frakturstabilität, was eine vorangehende aufwendige mechanische Materialtestung nötig macht. Einschränkend muss allerdings festgehalten werden, dass das hier beschriebene Verriegelungsmarknagel-Modell im Gegensatz zu Frakturmodellen, in denen ein Fixateur externe benutzt wird, keine axiale Stabilität nach Frakturversorgung gewährleistet und außerdem zu einer stärkeren Beeinträchtigung des Markraumes führt.

Die meisten Frakturstudien an der Maus werden an Femur- sowie Tibiamodellen durchgeführt. Die anatomischen Nachteile der Tibiamodelle sind in dem geringen, nach distal abnehmenden, dreieckigen Knochenquerschnitt zu sehen, der eine mangelhafte Vergleichsmöglichkeit für unterschiedliche Frakturlokalisationen bietet und eine biomechanische Testung erschwert. Zudem bedingt die kaum vorhandene Muskel- und Weichteildeckung der Tibia eine höhere Infektgefahr und schlechtere Blutversorgung im Vergleich zu Femurmodellen. Allerdings ist in diesem Zusammenhang anzumerken, dass die Frakturierung aufgrund der geringen Weichteildeckung in Tibiamodellen grundsätzlich einfacher durchzuführen ist (Cheung et al., 2003). Dennoch gewährleistete die Anwendung einer stumpfen Guillotine in unserem Femurmodell einen reproduzierbaren standardisierten Frakturverlauf bei minimalem Weichteilschaden. Durch den vor Frakturierung eingebrachten Führungsdraht war erstmals in einem geschlossenen Femur-Frakturmodell an der Maus eine Implantateinbringung vor Frakturierung nicht erforderlich, so dass unser Modell ein klinisches Trauma-Szenario widerspiegelt.

Der Femurschaft unterliegt als funktionell belasteter Knochen sowohl Biege- und Schub-, als auch Torsionsbewegungen, die sich unter Belastung im Sinne einer physiologischen Kraftverteilung gleichmäßig auf die Frakturzone und das Implantat verteilen (Radasch, 1999). Da die Versuchstiere ein bis drei Tage nach Frakturierung einen physiologischen Bewegungsablauf aufwiesen, ist davon auszugehen, dass die Extremität postoperativ bei stabiler Osteosynthese adäquat belastet wurde. Bei Tötung der Tiere zeigten sich in den Kontroll-Tieren keine Anzeichen von Wund- oder Knochenheilungsstörungen, Infekten oder sonstigen Pathologien bei standardisiert reproduzierbarer Frakturheilung. Entsprechend der histologischen Auswertung führte das beschriebene Modell in den unbehandelten Kontroll-Tieren zu einem typischen sekundären Frakturheilungsverlauf mit membranöser und enchondraler Ossifikation. Retrospektiv kann das gewählte Tiermodell somit ohne wesentliche Einschränkungen als reproduzierbar und für die Fragestellung geeignet beurteilt werden.

Auf Grundlage der Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen ( Bourque et al., 1992; Hiltunen et al., 1993a) wurden die Versuchstiere in der hier vorgestellten Arbeit nach zwei bzw. fünf Wochen post operationem getötet, um die Knochen für die weitere Auswertung zu explantieren. Die entsprechenden Standzeiten basieren auf der Intention, sowohl den kurzfristigen, als auch den langfristigen Einfluss von Rapamycin auf die Frakturheilung zu untersuchen. Bei der Maus verläuft die Knochenregenerationsrate wesentlich schneller als beim Menschen (Bourque et al., 1992). Manigrasso und O'Connor analysierten 2004 in einem Marknagel-Modell den zeitlichen Ablauf der Frakturheilung an der Maus (Manigrasso & O'Connor, 2004). Hierbei zeigte sich eine maximale Kallusbildung nach zwei Wochen. Entsprechend wurde dieser Zeitpunkt in unserer Studie für die Untersuchung der frühen Frakturheilung gewählt. Nach 28 Tagen wiesen in der erwähnten Studie die meisten Versuchstiere eine knöcherne Durchbauung des Frakturkallus auf, während sich der Knochen nach einer Dauer von sechs Wochen in der Phase des Remodeling befand. Demzufolge wurde der Zeitpunkt von fünf Wochen für die Untersuchung der späten Phase der Frakturheilung gewählt.

In den meisten Frakturmodellen wird die Knochenbruchheilung nach definierten Zeitabschnitten mit radiologischen, biomechanischen und histologischen Methoden analysiert.

Um die biomechanischen, histologischen und proteinbiochemischen Untersuchungen in unserer Studie durchzuführen, mussten die Versuchstiere getötet werden. Grundsätzlich ist es jedoch möglich, mit verschiedenen Bildgebungsverfahren die Frakturheilung auch am lebenden Tier zu analysieren. Mikro-PET- und Mikro-MRT-Untersuchungen, aber auch innovative Verfahren der molekularen Bildgebung wie etwa Biolumineszenz- oder Nukleartomographie eröffnen neue Möglichkeiten der Darstellung von Gewebemorphologie, Genexpression, Proteindegradation, Zellmigration und Zelltod in lebenden Tieren (Lee et al., 2008; Lu et al., 2005; Zachos et al., 2007). Etablierte Standardverfahren der Knochenbildung sind jedoch hochauflösende Röntgenaufnahmen und 2D- sowie 3D-Mikro-CT-Untersuchungen. Mittels konventioneller Röntgenaufnahmen ist es möglich, Größe und radiologische Dichte des Kallusgewebes sowohl in vivo als auch am resezierten Knochen zu analysieren (Augat et al., 2005; Garcia et al. 2008; Holstein et al., 2007b). In unserer Studie verwendeten wir die konventionelle Röntgendiagnostik, um die Pinlage nach Frakturversorgung sowie vor Tötung der Versuchstiere zu kontrollieren. Die Röntgenaufnahmen vor Tötung der Versuchstiere dienten zudem der quantitativen Analyse der Kallusgröße. Eine signifikante Korrelation der radiologischen und histologischen Ergebnisse bestätigt die Eignung dieser Messmethode für die Untersuchung der Kallusgröße.

Die quantitative histologische Auswertung (Histomorphometrie) des Frakturkallus stellt die Standardmethode in der Untersuchung der Frakturheilung dar (Gerstenfeld et al., 2005). Um standardisierte histomorphometrische Analysen zu gewährleisten, führten wir unsere Untersuchungen gemäß den Empfehlungen zu Messparametern und Nomenklatur der ASBMR durch (Parfitt et al., 1987). In Ergänzung zu histomorphometrischen Untersuchungen ermöglichen immunhistochemische Analysen die in-situ-Detektion von Proteinen wie Zytokinen und Zellmarkern innerhalb des Frakturkallus (Holstein et al., 2007b). Aufgrund der heterogenen dreidimensionalen Struktur des Frakturkallus ist es schwierig, die verschiedenen Gewebstypen standardisiert in zweidimensionalen Schnittpräparaten zu analysieren. Longitudinale Schnittpräparate im Bereich des maximalen Femurdurchmessers ermöglichen hierbei dennoch eine reproduzierbare und repräsentative Darstellung der Kallusgröße sowie der Gewebezusammensetzung des Frakturkallus. Entsprechend wählten wir in Anlehnung an vergleichbare Frakturstudien an Maus und Ratte eine longitudinale middiaphysäre Schnittführung, um den Frakturkallus histomorphometrisch auszuwerten (Gerstenfeld et al., 2005). Grundsätzlich besteht die Möglichkeit, sowohl calcifizierten als auch decalcifizierten Knochen histologisch aufzuarbeiten (Gerstenfeld et al., 2005). Die histologischen

Untersuchungen in dieser Studie wurden am decalcifizierten Knochen durchgeführt, da so die Option einer zusätzlichen immunhistochemischen Färbung der Schnittpräparate besteht. Ein Nachteil histomorphometrischer Analysen am decalcifizierten Knochen liegt darin, dass Aussagen zum Kalksalzgehalt des Knochens schwer möglich sind.

Generell stehen für die biomechanische Knochentestung drei etablierte Verfahren zur Verfügung: Die 3-Punkt-Biegung, die 4-Punkt-Biegung und die von uns verwendete Rotationstestung (Burstein & Frankel, 1971). Der Nachteil der 3-Punkt-Biegung liegt in der maximalen Belastung über nur einem Punkt des Knochens (Burstein & Frankel, 1971). Im Gegensatz dazu wird bei der 4-Punkt-Biegung die maximale Kraft über eine größere Fläche verteilt (Burstein & Frankel, 1971). Bei einer durchschnittlichen Länge des Mäusefemurs von etwa 15 mm (Manigrasso & O'Connor, 2004) ist die Verwendung einer 4-Punkt-Biegung technisch schwer umsetzbar. In beiden biomechanischen Biegungstestungsverfahren ist von Nachteil, dass nur ein geringfügiges Verdrehen des Knochens ausreicht, um die Präzision und Wiederholbarkeit der Testung stark einzuschränken (Lind et al., 2001). Der Vorteil der Rotationstestung liegt darin, dass hier leichte Veränderungen in der Knochengeometrie keine wesentlichen Auswirkungen auf eine gleichmäßige Verteilung des Drehmomentes über die gesamte Länge des Femurs und somit auf die Quantifizierung der Rotationssteifigkeit haben (Lind et al., 2001). Folglich sehen wir in der Rotationstestung eine geeignete Messmethode zur Untersuchung der biomechanischen Eigenschaften des heilenden Knochens.

Zur Erfassung der Zellproliferation im Bereich des Frakturkallus haben wir uns für einen Nachweis des Proliferationsmarkers PCNA mittels Western Blot entschieden. Wie in jedem regenerierenden Gewebe stellt auch während der Knochenheilung die Zellproliferation den zentralen Regenerationsprozess dar. Zellproliferation kann im Frakturkallus durch einen Antikörper gegen PCNA nachgewiesen werden, welches von der frühen G1-Phase bis zur S-Phase exprimiert wird. Während der G2- und M-Phase nimmt die Expression von PCNA ab. Rapamycin hemmt den Zellzyklus vor allem durch eine Down-Regulation von Cyclin D1 in der G1-Phase (Albers et al., 1993). Auch wenn die Spezifität von PCNA als Proliferationsmarker aufgrund seiner hohen Expressionsrate während der verschiedenen Phasen des Zellzyklus teilweise kontrovers diskutiert wurde (McCormick et al., 1993), konnten Wildemann et al. zeigen, dass PCNA einen zuverlässigen Marker zur Analyse der Zellproliferation während der Frakturheilung darstellt (Wildemann et al., 2003). Iwaki et al. konnten im Frakturkallus der Ratte eine vermehrte PCNA-Expression bis zum 14. Tag nach

Frakturierung nachweisen (Iwaki et al., 1997). Entsprechend dieser Studie analysierten wir die Expression von PCNA in der vorliegenden Arbeit ebenfalls nach zweiwöchiger Frakturheilung.

VEGF stellt einen Hauptangriffspunkt von Rapamycin dar (Guba et al., 2002), so dass wir eventuelle Auswirkungen von Rapamycin auf die Expression von VEGF während der Frakturheilung mittels Western Blot untersuchten. Street et al. konnten zeigen, dass VEGF eine entscheidende Rolle hinsichtlich der Einsprossung von Gefäßen in den Frakturkallus und der Calcifizierung des Frakturkallus spielt (Street et al., 2002). Da sowohl Vaskularisierung als auch Calcifizierung des Frakturkallus an der Maus nach etwa zweiwöchiger Frakturheilung zu beobachten sind, analysierten wir die Expression von VEGF am Tag 14 nach Frakturierung.

## **5.2 Diskussion der Ergebnisse**

Rapamycin wird bereits als viel versprechendes Immunsuppressivum in der Transplantationsmedizin eingesetzt (Podbielski & Schoenberg, 2001; Trotter, 2003). Es wird in der Kardiologie aber ebenso zur Beschichtung koronarer Stents verwendet, da es aufgrund seiner antiangiogenen Eigenschaften erfolgreich eine Restenose verhindern (Muller et al., 2002). Des Weiteren wurde in mehreren tierexperimentellen Studien eine wirksame Hemmung des Tumorwachstums sowie der Tumormetastasierung durch Rapamycin nachgewiesen (Guba et al., 2002; Guba et al., 2005), so dass Rapamycin als antiangiogenes Medikament bald auch in der Onkologie einen weiteren Anwendungsbereich finden könnte. Vor diesem Hintergrund ist davon auszugehen, dass im Laufe der nächsten Jahre die Zahl der Patienten, die mit Rapamycin therapiert werden, weiter steigen wird.

Osteoporose und damit verbundene Frakturen sind eine der Hauptkomplikationen nach Organtransplantationen, die Lebensqualität und Prognose der Patienten massiv beeinträchtigen (Navasa et al., 1996). Da es sich bei Transplantatempfängern häufig um jüngere aktive Patienten handelt, sind neben osteoporotisch bedingten Frakturen aber auch traumatische Knochenbrüche keine Seltenheit. Entsprechend ist davon auszugehen, dass in Folge einer weiter steigenden Zahl an Organtransplantationen und einer zunehmenden Rate an

Rapamycin-Applikationen auch die Anzahl der Patienten, die unter einer Rapamycin-Medikation eine Fraktur erleiden, wachsen wird.

Eine Implantatabstoßung kann nach wie vor nur durch eine konsequente Immunsuppression verhindert werden. Obwohl in mehreren Studien eine Interaktion immunsuppressiver Medikamente wie Cyclosporin A oder Tacrolimus (FK506) mit dem Knochenstoffwechsel gezeigt wurde (Compston, 2003; Stempfle et al., 2002; Vossen et al., 2005), scheint Cyclosporin A und FK506 keinen negativen Einfluss auf die Frakturheilung auszuüben (Voggenreiter et al., 2005; Warren et al., 1985). Nach 16 Wochen Frakturheilung unter Cyclosporin-Applikation konnte im Rattenmodell sogar eine signifikant erhöhte Torsionssteifigkeit des heilenden Femurs aufgezeigt werden (Warren et al., 1985).

Wie bereits erwähnt, besitzt Rapamycin nicht nur immunsuppressive Eigenschaften, sondern wirkt über eine Hemmung von VEGF zusätzlich antiangiogen (Guba et al., 2002). Dies ist von besonderer Bedeutung, da VEGF eine wichtige Rolle bei der Formation und Mineralisierung neuen Knochens (Amizuka et al., 2003; Geiger et al., 2005) sowie der Gefäßneubildung im Rahmen der Frakturheilung spielt (Li et al., 2005). Ob Rapamycin folglich ein knochenschädigendes Potential besitzt, bzw. die Knochenbruchheilung beeinflusst, war bislang völlig unbekannt.

Radiologisch, histologisch und biomechanisch zeigte sich in der hier vorgestellten Arbeit eine deutliche Störung der frühen Frakturheilung durch eine tägliche Applikation von Rapamycin. So ergab sowohl die radiologische als auch die histomorphometrische Auswertung eine signifikant verminderte Kallusfläche nach zweiwöchiger Frakturheilung unter Rapamycin-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Kontroll-Tieren. In der histomorphometrischen Untersuchung des Frakturkallus ließ sich zu diesem Zeitpunkt zudem ein signifikant geringerer Anteil an Knochen unter Rapamycin-Behandlung nachweisen. Diese morphometrischen Ergebnisse korrespondierten mit einer signifikant verminderten Torsionssteifigkeit des Frakturkallus in der biomechanischen Testung der Knochen.

Von anderen Arbeitsgruppen wurden bereits die Einflüsse von Rapamycin auf den sich im Wachstum befindlichen Knochen bzw. auf die osteogene Differenzierung mesenchymaler Knochenmarks- und Stromazellen dargestellt (Alvarez-Garcia et al., 2007; Singha et al., 2008). Alvarez-Garcia et al. zeigten, dass Rapamycin in heranwachsenden Ratten das



Knochenwachstum massiv beeinträchtigt (Alvarez-Garcia et al., 2007). Chondrozytenproliferation und Neovaskularisation spielen eine maßgebliche Rolle im enchondralen Ossifikationsprozess des Knochenwachstums (Alvarez-Garcia et al., 2007). Unter Rapamycin-Applikation stellte sich die Proliferationszone der Wachstumsfuge als ungeordnet unter Verlust der üblichen Säulenkonfiguration der Knorpelzellen dar (Alvarez-Garcia et al., 2007). Außerdem wurde ein signifikanter Größenverlust der Chondrozyten Rapamycin-behandelter Tiere verbunden mit einer verminderten Proliferationsrate festgestellt (Alvarez-Garcia et al., 2007). In diesem Zusammenhang scheint Rapamycin den Prozess der Reifung und Hypertrophie von Chondrozyten zu beeinflussen und somit den Abbau von Chondrozyten in der Wachstumsfuge zu verhindern. Der Prozess der enchondralen Ossifikation in der Frakturheilung und dem Knochenwachstums weist zahlreiche Homologien auf, so dass die gestörte Frakturheilung und das beeinträchtigte Knochenwachstum unter Rapamycin-Behandlung auf vergleichbaren Pathomechanismen beruhen könnten.

Singha et al. konnten in vitro zeigen, dass Rapamycin über eine Inhibierung von mTOR die Expression verschiedener Osteoblasten-Marker, wie etwa alkalische Phosphatase (ein frühzeitiger Differenzierungsmarker), Osteocalcin, bone sialoprotein (beide späte Differenzierungsmarker), Osterix (ein Osteoblasten-spezifischer Transskriptionsfaktor), aber auch die Mineralisationsleistung von Osteoblasten beeinträchtigt (Singha et al., 2008). Rapamycin scheint dabei die Osteoblastenproliferation und -differenzierung über eine Downregulation des Transkriptionsfaktors Runx2 zu hemmen (Singha et al., 2008). Entsprechend dieser Ergebnisse muss davon ausgegangen werden, dass Rapamycin über eine Beeinflussung der Osteoblastenproliferation und -differenzierung die Frakturheilung stört. Die proteinbiochemischen Analysen des Frakturkallus in unserer Studie zeigten nach zweiwöchiger Frakturheilung eine signifikant verminderte Expression des Proliferationsmarkers PCNA unter täglicher Rapamycin-Applikation im Vergleich zu unbehandelten Kontroll-Tieren. Diese Ergebnisse bestätigen, dass Rapamycin die Zellproliferation innerhalb des Frakturkallus hemmt. Phornphutkul et al. konnten im Gegensatz dazu keine Effekte von Rapamycin auf die Zellproliferation von Chondrozyten unter Verwendung des Proliferationsmarkers BrdU (Bromodeoxyuridin) nachweisen (Phornphutkul et al., 2008). Während der Frakturheilung wird PCNA in periostalen Zellen sowie in proliferierenden Chondroblasten, Osteoblasten und Endothelzellen exprimiert. (Iwaki et al., 1997). Entsprechend ist eine Proliferationshemmung der beschriebenen Zelltypen durch Rapamycin zu diskutieren.

Neben einer verminderten Expression des Proliferationsmarkers PCNA ergaben die Western-Blot-Analysen zudem eine Minderexpression des osteogenen und angiogenen Wachstumsfaktors VEGF. Als Ursache des reduzierten VEGF-Gehaltes innerhalb des Frakturkallus ist entweder eine geringere Anzahl an VEGF-exprimierenden Zellen oder eine herabgesetzte Expressionsrate der VEGF-produzierenden Zellen zu diskutieren. Vorangegangene Studien konnten zeigen, dass nach zweiwöchiger Frakturheilung in der Maus VEGF vor allem von hypertrophen Chondrozyten, aber auch von proliferierenden Endothelzellen und Osteoblasten exprimiert wird (Carlevaro et al., 2000). In unserer histomorphometrischen Analyse der Gewebekomposition des Frakturkallus fanden wir einen minimal erhöhten Anteil an Knorpelgewebe bei einer signifikant verminderter Fraktion an Knochengewebe nach zweiwöchiger Frakturheilung unter Rapamycin-Behandlung verglichen mit den unbehandelten Kontroll-Tieren. Entsprechend dieser Ergebnisse könnte eine Reduktion der Anzahl VEGF-produzierender proliferierender Osteoblasten durch Rapamycin für den verminderten VEGF-Gehalt im Frakturkallus verantwortlich sein. Eine Hemmung der Osteoblasten-Proliferation durch Rapamycin legen auch die proteinbiochemischen Analysen der PCNA-Expression innerhalb des Frakturkallus nahe, die eine signifikant reduzierte Zellproliferationsrate im Frakturkallus anzeigen. Der zweite Erklärungsansatz für die geringere VEGF-Konzentration im Frakturkallus nach Rapamycin-Behandlung ist eine herabgesetzte VEGF-Expressionsrate innerhalb der einzelnen Zellen. So konnte im Rattenmodell gezeigt werden, dass Rapamycin zu einer reduzierten VEGF-Expression von hypertrophen Chondrozyten innerhalb der Wachstumsfugen führt (Alvarez-Garcia et al., 2007). Diese These wird zudem von in-vitro-Studien bestätigt, die ebenfalls von einer Hemmung der zellulären VEGF-Produktion und -Sekretion durch Rapamycin berichten (Guba et al., 2002).

Grundsätzlich stellt VEGF einen essentiellen Wachstumsfaktor während der Frakturheilung dar. Unmittelbar nach der Frakturierung eines Knochens setzt in der Frakturzone eine starke Zellproliferation vor allem von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Mastzellen verbunden mit einer überschießenden Kapillareinsprossung ein. Diese Neovaskularisation dient nicht nur der Nutrition vorhandener Zellen, sondern führt ebenso zu einem „Einschwemmen“ sowie zur Proliferation mesenchymaler Zellen aus dem Gefäßendothel (Tremain et al., 2001). Für diese frühe Neovaskularisation ist hauptsächlich der proangiogene Wachstumsfaktor VEGF verantwortlich (Street et al., 2002). Entsprechend

konnte gezeigt werden, dass eine Blockade des VEGF-Rezeptors das Einsprossen von Blutgefäßen in die Frakturzone nahezu vollständig unterdrückt (Gerber et al., 1999; Street et al., 2002). Vor diesem Hintergrund ist davon auszugehen, dass auch eine Rapamycin-vermittelte Hemmung von VEGF die Neovaskularisation während der frühen Phase der Frakturheilung beeinträchtigt. Diese These wird zudem durch in-vitro-Studien gestützt, in denen Rapamycin die VEGF-abhängige Formierung tubulärer Endothelzellen aus dem Nabelschnur-Blut (human umbilical cord vein endothelial cells, HUVEC) inhibierte (Guba et al., 2002; Ferrara, 1995). Da das Einsprossen neuer Blutgefäße überdies hinaus für die Weiterdifferenzierung mesenchymaler Zellen im Rahmen der enchondralen Ossifikation von großer Bedeutung ist (Caplan, 1990), dürfte die antiangiogene Wirkung von Rapamycin indirekt auch die Differenzierung und Proliferation mesenchymaler Zellen beeinflussen.

Im weiteren Verlauf der Frakturheilung ist VEGF für die Resorption von hypertrophem Knorpelgewebe verantwortlich. So konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass eine Blockierung von VEGF zu einer signifikant verzögerten Rekrutierung und Differenzierung von Mediatoren der Knorpelresorption sowie zu einer Hemmung von Chondroklasten führt (Gerber et al., 1999). Überdies hinaus scheint eine Hemmung von VEGF eine signifikante Reduktion der nodulären Osteoblastenformierung sowie der osteoblastären Produktion alkalischer Phosphatase zu bewirken, woraus wiederum die, in unserer Studie beobachtete, Abnahme des Gesamtkallusvolumens sowie des knöchernen Anteils am Kallus resultieren könnte (Street et al., 2002).

Schaffer et al. konnten zeigen, dass eine systemische Gabe von Rapamycin auch die dermale Wundheilung durch eine Inhibierung von VEGF beeinträchtigt (Schaffer et al., 2007). So fand sich die VEGF-Expression in Hautläsionen unter Rapamycin-Behandlung stark herabgesetzt, wobei davon auszugehen ist, dass Rapamycin die Wundheilung vor allem in den oberen Hautschichten über eine VEGF-Inhibierung beeinflusst, weniger jedoch die Kollagenformation in den tieferen Hautschichten (Schaffer et al., 2007).

Im Gegensatz zu den ersten zwei Wochen konnte nach fünfwöchiger Frakturheilung keinerlei Beeinträchtigung der Frakturheilung durch die Rapamycin-Applikation festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Frakturheilung nach fünf Wochen an der Maus bereits größtenteils abgeschlossen ist, und dass dadurch Effekte von Rapamycin auf die Knochenbruchheilung zu diesem späten Zeitpunkt nicht mehr detektierbar sind.

Andererseits könnte die spezifische Hemmung von T-Zellen innerhalb des bindegewebigen Frakturkallus durch Rapamycin die Frakturheilung im späteren Verlauf beschleunigen. So ist aus verschiedenen Studien bekannt, dass sich der bindegewebige Frakturkallus im Rahmen von verzögerten Frakturheilungsverläufen größtenteils aus T-Lymphozyten zusammensetzt (Andrew et al., 1994; Santavirta et al., 1992). Im Rahmen der zeitgerechten physiologischen Frakturheilung finden sich T-Zellen initial in der Frakturzone innerhalb des Granulationsgewebes. Im weiteren Verlauf der Knochenbruchheilung hingegen verschwindet dieser Zelltyp, so dass in Bereichen, in denen sich Knochen- und Knorpelgewebe formiert hat, keine T-Zellen mehr nachgewiesen werden können. Über die Hemmung von mTOR inhibiert Rapamycin den Zellzyklus von aktivierten T-Zellen, was zu einer Suppression der S6-Proteinkinase-vermittelten Proteinsynthese sowie der Interleukin-2-vermittelten T-Zell-Proliferation führt (Sigal & Dumont, 1992). Entsprechend könnte durch Rapamycin ein Abbau des bindegewebigen Kallusanteils gefördert werden. Demzufolge stellen wir die Hypothese auf, dass der initiale negative Effekt von Rapamycin auf die Knochenbruchheilung aufgehoben wird und so die primär gestörte Frakturheilung über eine T-Zell-Hemmung im späteren Verlauf beschleunigt wird.

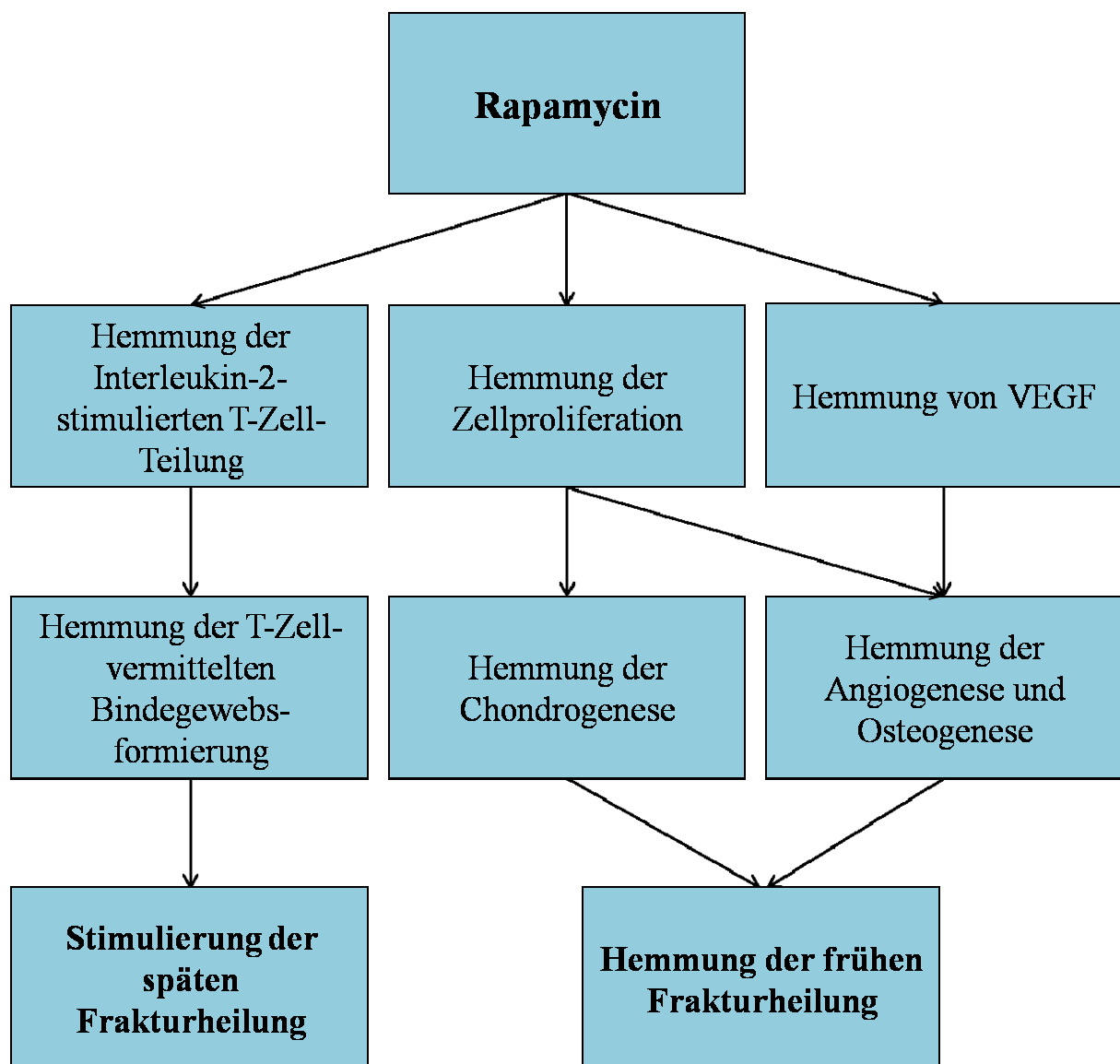


Abb. 32: Flussdiagramm: Potentielle Angriffspunkte von Rapamycin in der Frakturheilung

### 5.3 Schlussfolgerungen

1. Das angewandte Tiermodell erwies sich als zuverlässig, um die Frakturheilung zu überprüfen und die Fragestellung dieser Studie zu beantworten. Die entsprechenden radiologischen, biomechanischen, histologischen und proteinbiochemischen Auswertemethoden lieferten reproduzierbare und untereinander vergleichbare Daten. Hierbei zeigte sich eine Korrelation der biomechanischen Eigenschaften des Frakturkallus mit der radiologisch und histomorphometrisch bestimmten Kallusfläche.

2. Sowohl die biomechanischen Messungen als auch die histologischen und radiologischen Untersuchungen zeigten in beiden Versuchsgruppen eine fortgeschrittene Frakturheilung sowie eine höhere Stabilität des Knochens nach fünfwöchiger Knochenbruchheilung verglichen mit den Ergebnissen nach zweiwöchiger Frakturheilung.
3. Nach zweiwöchiger Frakturheilung ergab die radiologische, biomechanische und histomorphometrische Auswertung eine massive Beeinträchtigung der Knochenbruchheilung unter täglicher Rapamycin-Behandlung. Hiermit verbunden war eine signifikant verminderte Expression des angiogenen und osteogenen Wachstumsfaktors VEGF sowie des Proliferationsmarkers PCNA in den proteinbiochemischen Analysen.
4. Im Gegensatz zu den ersten zwei Wochen zeigten sich nach fünfwöchiger Frakturheilung keinerlei Unterschiede in der radiologischen, biomechanischen und histomorphometrischen Auswertung der Frakturheilung zwischen Rapamycin-behandelten Tieren und unbehandelten Kontrollen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Abraham RT & Wiederrecht GJ (1996) Immunopharmacology of rapamycin. *Annu Rev Immunol* 14: 483-510
2. Adams DS, Klevjer-Anderson P, Carlson JL, McGuire TC & Gorham JR (1983) Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. *Am J Vet Res* 44: 1670-1675
3. Albers MW, Williams RT, Brown EJ, Tanaka A, Hall FL & Schreiber SL (1993) FKBP-rapamycin inhibits a cyclin-dependent kinase activity and a cyclin D1-Cdk association in early G1 of an osteosarcoma cell line. *J Biol Chem* 268: 22825-22829
4. Alvarez-Garcia O, Carbajo-Perez E, Garcia E, Gil H, Molinos I, Rodriguez J, Ordonez FA & Santos F (2007) Rapamycin retards growth and causes marked alterations in the growth plate of young rats. *Pediatr Nephrol* 22: 954-961
5. Amizuka N, Shimomura J, Maeda T & Ozawa H (2003) Mineralization and vascular invasion during endochondral bone formation. *Clin Calcium* 13: 405-412
6. Andrew JG, Andrew SM, Freemont AJ & Marsh DR (1994) Inflammatory cells in normal human fracture healing. *Acta Orthop Scand* 65: 462-466
7. Ashhurst DE, Hogg J & Perren SM (1982) A method for making reproducible experimental fractures of the rabbit tibia. *Injury* 14: 236-242
8. Augat P, Simon U, Liedert A & Claes L (2005) Mechanics and mechano-biology of fracture healing in normal and osteoporotic bone. *Osteoporos Int* 16 Suppl 2: S36-43
9. Baird A, Mormede P & Bohlen P (1985) Immunoreactive fibroblast growth factor in cells of peritoneal exudate suggests its identity with macrophage-derived growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 126: 358-364
10. Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A & Marme D (1996) Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 87: 3336-3343
11. Barone GW, Gurley BJ, Abul-Ezz SR & Gokden N (2003) Sirolimus-induced thrombotic microangiopathy in a renal transplant recipient. *Am J Kidney Dis* 42: 202-206
12. Black J, Balligand MH, Nunamaker DM & Brighton CT (1985) Electrical Stimulation of fresh fractures: Faradic stimulation of tibial osteotomies in the dog. *Trans Orthop Res Soc* 10: 29
13. Boecker W, Denk H & Heitz PU (2004) Pathologie. Urban & Fischer Bei Elsevier.

14. Bolander ME (1992) Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc Soc Exp Biol Med* 200: 165-170
15. Bonnarens F & Einhorn TA (1984) Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J Orthop Res* 2: 97-101
16. Bouletreau PJ, Warren SM, Spector JA, Peled ZM, Gerrets RP, Greenwald JA & Longaker MT (2002) Hypoxia and VEGF up-regulate BMP-2 mRNA and protein expression in microvascular endothelial cells: implications for fracture healing. *Plast Reconstr Surg* 109: 2384-2397
17. Bourque WT, Gross M & Hall BK (1992) A reproducible method for producing and quantifying the stages of fracture repair. *Lab Anim Sci* 42: 369-374
18. Boyle WJ, Simonet WS & Lacey DL (2003) Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423: 337-342
19. Brighton CT, Hozack WJ, Brager MD, Windsor RE, Pollack SR, Vreslovic EJ & Kotwick JE (1985) Fracture healing in the rabbit fibula when subjected to various capacitively coupled electrical fields. *J Orthop Res* 3: 331-340
20. Brighton CT & Hunt RM (1997) Early histologic and ultrastructural changes in microvessels of periosteal callus. *J Orthop Trauma* 11: 244-253
21. Bucher O & Wartenberg H (1997) *Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*. Huber, Bern.
22. Burstein AH & Frankel VH (1971) A standard test for laboratory animal bone. *J Biomech* 4: 155-158
23. Camardo J (2003) The Rapamune era of immunosuppression 2003: the journey from the laboratory to clinical transplantation. *Transplant Proc* 35: 18S-24S
24. Caplan AI (1990) Cartilage begets bone versus endochondral myelopoiesis. *Clin Orthop Relat Res* 257-267
25. Carlevaro MF, Cermelli S, Cancedda R & Descalzi Cancedda F (2000) Vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage neovascularization and chondrocyte differentiation: auto-paracrine role during endochondral bone formation. *J Cell Sci* 113: 59-69
26. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoek A & al. (1996) Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380: 435-439
27. Chao EY, Aro HT, Lewallen DG & Kelly PJ (1989) The effect of rigidity on fracture healing in external fixation. *Clin Orthop Relat Res* 24-35



28. Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Boocock CA, Ahmed A, Plevin R, Ferrara N & Smith SK (1994) Vascular endothelial growth factor receptor localization and activation in human trophoblast and choriocarcinoma cells. *Biol Reprod* 51: 524-530
29. Chavakis E, Riecke B, Lin J, Linn T, Bretzel RG, Preissner KT, Brownlee M & Hammes HP (2002) Kinetics of integrin expression in the mouse model of proliferative retinopathy and success of secondary intervention with cyclic RGD peptides. *Diabetologia* 45: 262-267
30. Cheal EJ, Mansmann KA, DiGioia AMr, Hayes WC & Perren SM (1991) Role of interfragmentary strain in fracture healing: ovine model of a healing osteotomy. *J Orthop Res* 9: 131-142
31. Cheung KM, Kaluarachi K, Andrew G, Lu W, Chan D & Cheah KS (2003) An externally fixed femoral fracture model for mice. *J Orthop Res* 21: 685-690
32. Claes LE, Heigele CA, Neidlinger-Wilke C, Kaspar D, Seidl W, Margevicius KJ & Augat P (1998) Effects of mechanical factors on the fracture healing process. *Clin Orthop Relat Res* S132-47
33. Compston JE (2003) Osteoporosis after liver transplantation. *Liver Transpl* 9: 321-330
34. Critchlow MA, Bland YS & Ashhurst DE (1995) The effect of exogenous transforming growth factor-beta 2 on healing fractures in the rabbit. *Bone* 16: 521-527
35. Curtis MJ, Brown PR, Dick JD & Jinnah RH (1995) Contaminated fractures of the tibia: a comparison of treatment modalities in an animal model. *J Orthop Res* 13: 286-295
36. Cvetkovic M, Mann GN, Romero DF, Liang XG, Ma Y, Jee WS & Epstein S (1994) The deleterious effects of long-term cyclosporine A, cyclosporine G, and FK506 on bone mineral metabolism in vivo. *Transplantation* 57: 1231-1237
37. Danckwardt-Liliestrom G, Lorenzi GL & Olerud S (1970) Intramedullary nailing after reaming: An investigation on the on the process in osteomized rabbit tibias. *Acta Orthop Scand* 134: 1-78
38. Daum WJ, Chang SL, Simmons DJ, Webster D & Shoenecker PL (1983) Healing of canine femoral osteotomies. Effects of compression plates versus Eggers' plates. *Clin Orthop Relat Res* 291-300
39. Davy DT & Connolly JF (1982) The biomechanical behavior of healing canine radii and ribs. *J Biomech* 15: 235-247
40. Deckers MM, Karperien M, van der Bent C, Yamashita T, Papapoulos SE & Lowik CW (2000) Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors

- during osteoblast differentiation. *Endocrinology* 141: 1667-1674
41. Deibert MC, Mcleod BR, Smith SD & Liboff AR (1994) Ion resonance electromagnetic field stimulation of fracture healing in rabbits with a fibular ostectomy. *J Orthop Res* 12: 878-885
  42. DiJoseph JF, Fluhler E, Armstrong J, Sharr M & Sehgal SN (1996) Therapeutic blood levels of sirolimus (rapamycin) in the allografted rat. *Transplantation* 62: 1109-1112
  43. Drosse I, Volkmer E, Seitz S, Seitz H, Penzkofer R, Zahn K, Matis U, Mutschler W & al. (2008) Validation of a femoral critical size defect model for orthotopic evaluation of bone healing: a biomechanical, veterinary and trauma surgical perspective. *Tissue Eng Part C Methods* 14: 79-88
  44. Egger EL, Gottsauner-Wolf F, Palmer J, Aro HT & Chao EY (1993) Effects of axial dynamization on bone healing. *J Trauma* 34: 185-192
  45. Einhorn TA (1998) The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* S7-21
  46. Einhorn TA, Majeska RJ, Rush EB, Levine PM & Horowitz MC (1995) The expression of cytokine activity by fracture callus. *J Bone Miner Res* 10: 1272-1281
  47. Ekici Y, Emiroglu R, Ozdemir H, Aldemir D, Karakayali H & Haberal M (2007) Effect of rapamycin on wound healing: an experimental study. *Transplant Proc* 39: 1201-1203
  48. Elmstedt E (1981) Skeletal complications in the renal transplant recipient. A clinical study. *Acta Orthop Scand Suppl* 190: 1-44
  49. Ferguson C, Alpern E, Miclau T & Helms JA (1999) Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? *Mech Dev* 87: 57-66
  50. Ferrara N (1995) The role of vascular endothelial growth factor in pathological angiogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 36: 127-137
  51. Ferrara N (1999) Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med* 77: 527-543
  52. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ & al. (1996) Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380: 439-442
  53. Ferrara N & Henzel WJ (1989) Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 161: 851-858
  54. Ferrara N & Keyt B (1997) Vascular endothelial growth factor: basic biology and

- clinical implications. *EXS* 79: 209-232
55. Fleisch H (1997) Bisphosphonates: mechanisms of action and clinical use in osteoporosis-an update. *Horm Metab Res* 29: 145-150
56. Friedman RJ, An YH, Ming J, Draughn RA & Bauer TW (1996) Influence of biomaterial surface texture on bone ingrowth in the rabbit femur. *J Orthop Res* 14: 455-464
57. Gabl M, Pechlaner S, Lutz M, Bodner G, Piza H & Margreiter R (2004) Bilateral hand transplantation: bone healing under immunosuppression with tacrolimus, mycophenolate mofetil, and prednisolone. *J Hand Surg [Am]* 29: 1020-1027
58. Garcia P, Holstein JH, Maier S, Schaumlöffel H, Al-Marrawi F, Hannig M, Pohlemann T & Menger MD (2008) Development of a reliable non-union model in mice. *J Surg Res* 147: 84-91
59. Geiger F, Bertram H, Berger I, Lorenz H, Wall O, Eckhardt C, Simank HG & Richter W (2005) Vascular endothelial growth factor gene-activated matrix (VEGF165-GAM) enhances osteogenesis and angiogenesis in large segmental bone defects. *J Bone Miner Res* 20: 2028-2035
60. Georgiadis GM, Minster GJ & Moed BR (1990) Effects of dynamization after interlocking tibial nailing: an experimental study in dogs. *J Orthop Trauma* 4: 323-330
61. Gerber HP & Ferrara N (2000) Angiogenesis and bone growth. *Trends Cardiovasc Med* 10: 223-228
62. Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z & Ferrara N (1999) VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 5: 623-628
63. Gerstenfeld LC, Wronski TJ, Hollinger JO & Einhorn TA (2005) Application of histomorphometric methods to the study of bone repair. *J Bone Miner Res* 20: 1715-1722
64. Gospodarowicz D, Abraham JA & Schilling J (1989) Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 7311-7315
65. Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, Koehl G, Flegel S, Hornung M, Bruns CJ, Zuelke C & al. (2002) Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med* 8: 128-135
66. Guba M, Yezhelyev M, Eichhorn ME, Schmid G, Ischenko I, Papyan A, Graeb C,

- Seeliger H & al. (2005) Rapamycin induces tumor-specific thrombosis via tissue factor in the presence of VEGF. *Blood* 105: 4463-4469
67. Guilbeau JM (2002) Delayed wound healing with sirolimus after liver transplant. *Ann Pharmacother* 36: 1391-1395
68. Harada S, Rodan SB & Rodan GA (1995) Expression and regulation of vascular endothelial growth factor in osteoblasts. *Clin Orthop Relat Res* 76-80
69. Harper J & Klagsbrun M (1999) Cartilage to bone--angiogenesis leads the way. *Nat Med* 5: 617-618
70. Heckman JD, Boyan BD, Aufdemorte TB & Abbott JT (1991) The use of bone morphogenetic protein in the treatment of non-union in a canine model. *J Bone Joint Surg Am* 73: 750-764
71. Henry WBJ, Schachar NS, Wadsworth PL, Castronovo FPJ & Mankin HJ (1985) Feline model for the study of frozen osteoarticular hemijoint transplantation: qualitative and quantitative assessment of bone healing. *Am J Vet Res* 46: 1714-1720
72. Herrgesell JD (1967) Aspirin poisoning in the cat. *J Am Vet Med Assoc* 151: 452-455
73. Hietaniemi K, Peltonen J & Paavolainen P (1995) An experimental model for non-union in rats. *Injury* 26: 681-686
74. Hiltunen A, Aro HT & Vuorio E (1993) Regulation of extracellular matrix genes during fracture healing in mice. *Clin Orthop Relat Res* 23-27
75. Hiltunen A, Vuorio E & Aro HT (1993) A standardized experimental fracture in the mouse tibia. *J Orthop Res* 11: 305-312
76. Holstein JH, Menger MD, Culemann U, Meier C & Pohlemann T (2007) Development of a locking femur nail for mice. *J Biomech* 40: 215-219
77. Holstein JH, Menger MD, Scheuer C, Meier C, Culemann U, Wirbel RJ, Garcia P & Pohlemann T (2007) Erythropoietin (EPO): EPO-receptor signaling improves early endochondral ossification and mechanical strength in fracture healing. *Life Sci* 80: 893-900
78. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B & Leung DW (1991) The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 5: 1806-1814
79. Ito H, Akiyama H, Shigeno C, Iyama K, Matsuoka H & Nakamura T (1999) Hedgehog signaling molecules in bone marrow cells at the initial stage of fracture repair. *Biochem Biophys Res Commun* 262: 443-451
80. Iwaki A, Jingushi S, Oda Y, Izumi T, Shida JI, Tsuneyoshi M & Sugioka Y (1997)

- Localization and quantification of proliferating cells during rat fracture repair: detection of proliferating cell nuclear antigen by immunohistochemistry. *J Bone Miner Res* 12: 96-102
81. Jacenko O & Olsen BR (1995) Transgenic mouse models in studies of skeletal disorders. *J Rheumatol Suppl* 43: 39-41
82. Johnson AL & Stein LE (1988) Morphologic comparison of healing patterns in ethylene oxide-sterilized cortical allografts and untreated cortical autografts in the dog. *Am J Vet Res* 49: 101-105
83. Jones RD, Baynes RE & Nimitz CT (1992) Nonsteroidal anti-inflammatory drug toxicosis in dogs and cats: 240 cases (1989-1990). *J Am Vet Med Assoc* 201: 475-477
84. Joukov V, Kaipainen A, Jeltsch M, Pajusola K, Olofsson B, Kumar V, Eriksson U & Alitalo K (1997) Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C. *J Cell Physiol* 173: 211-215
85. Junqueira LC, Carneiro J & Gratzl M (2004) Histologie. Neue Approbationsordnung (Springer-Lehrbuch). Springer, Berlin.
86. Jussila L & Alitalo K (2002) Vascular growth factors and lymphangiogenesis. *Physiol Rev* 82: 673-700
87. Jussila L, Valtola R, Partanen TA, Salven P, Heikkila P, Matikainen MT, Renkonen R, Kaipainen A & al. (1998) Lymphatic endothelium and Kaposi's sarcoma spindle cells detected by antibodies against the vascular endothelial growth factor receptor-3. *Cancer Res* 58: 1599-1604
88. Kahan BD, Conti D & Pescovitz MD (2002) Langzeitanwendung von Sirolimus ist sicher und gut verträglich. Immunsuppression mit Sirolimus: Neue Wege in der Transplantationsmedizin 27-28
89. Kakeji Y, Koga T, Sumiyoshi Y, Shibahara K, Oda S, Maehara Y & Sugimachi K (2002) Clinical significance of vascular endothelial growth factor expression in gastric cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 21: 125-129
90. Kaplan SJ, Hayes WC, Mudan P, Lelli JL & White AA (1985) Monitoring the healing of a tibial osteotomy in the rabbit treated with external fixation. *J Orthop Res* 3: 325-330
91. Kaspar K, Schell H, Toben D, Matziolis G & Bail HJ (2007) An easily reproducible and biomechanically standardized model to investigate bone healing in rats, using external fixation. *Biomed Tech (Berl)* 52: 383-390
92. Katoh O, Tauchi H, Kawaishi K, Kimura A & Satow Y (1995) Expression of the

- vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. *Cancer Res* 55: 5687-5692
93. Kirken RA & Wang YL (2003) Molecular actions of sirolimus: sirolimus and mTor. *Transplant Proc* 35: 227S-230S
94. Kirker-Head CA, Gerhart TN, Schelling SH, Hennig GE, Wang E & Holtrop ME (1995) Long-term healing of bone using recombinant human bone morphogenetic protein 2. *Clin Orthop Relat Res* 222-230
95. Koch P, Müller ME & Nazarian S (1990) *The Comprehensive Classification of Fractures of Long Bones*. Springer, B.
96. Kuypers DR (2005) Benefit-risk assessment of sirolimus in renal transplantation. *Drug Saf* 28: 153-181
97. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
98. Lee A, Christenson LK, Patton PE, Burry KA & Stouffer RL (1997) Vascular endothelial growth factor production by human luteinized granulosa cells in vitro. *Hum Reprod* 12: 2756-2761
99. Lee SW, Padmanabhan P, Ray P, Gambhir SS, Doyle T, Contag C, Goodman SB & Biswal S (2008) Stem cell-mediated accelerated bone healing observed with in vivo molecular and small animal imaging technologies in a model of skeletal injury. *J Orthop Res*
100. Lenehan TM, Balligand M, Nunamaker DM & Wood FEJ (1985) Effect of EHDP on healing in dogs. *J Orthop Res* 3: 499-507
101. Lewallen DG, Chao EY, Kasman RA & Kelly PJ (1984) Comparison of the effects of compression plates and external fixators on early bone-healing. *J Bone Joint Surg Am* 66: 1084-1091
102. Li G, Cui Y, McIlmurray L, Allen WE & Wang H (2005) rhBMP-2, rhVEGF(165), rhPTN and thrombin-related peptide, TP508 induce chemotaxis of human osteoblasts and microvascular endothelial cells. *J Orthop Res* 23: 680-685
103. Lind PM, Lind L, Larsson S & Orberg J (2001) Torsional testing and peripheral quantitative computed tomography in rat humerus. *Bone* 29: 265-270
104. Lu C, Miclau T, Hu D, Hansen E, Tsui K, Puttlitz C & Marcucio RS (2005) Cellular basis for age-related changes in fracture repair. *J Orthop Res* 23: 1300-1307
105. Maloney JP, Silliman CC, Ambruso DR, Wang J, Tudor RM & Voelkel NF (1998) In

- vitro release of vascular endothelial growth factor during platelet aggregation. *Am J Physiol* 275: H1054-61
106. Manigrasso MB & O'Connor JP (2004) Characterization of a closed femur fracture model in mice. *J Orthop Trauma* 18: 687-695
107. Mayer-Kuckuk P & Boskey AL (2006) Molecular imaging promotes progress in orthopedic research. *Bone* 39: 965-977
108. McCormick D, Yu C, Hobbs C & Hall PA (1993) The relevance of antibody concentration to the immunohistological quantification of cell proliferation-associated antigens. *Histopathology* 22: 543-547
109. Morris RE (1992) Rapamycins: antifungal, antitumor, antiproliferative and immunosuppressive macrolides. *Transplant. Rev.* 6: 39-78
110. Muller J, Schenk R & Willenegger H (1968) [Experimental studies on the development of reactive pseudarthroses on the canine radius]. *Helv Chir Acta* 35: 301-308
111. Muller R, Bullesfeld L, Gerckens U & Grube E (2002) [State of treatment of coronary artery disease by drug releasing stents]. *Herz* 27: 508-513
112. Nakase T, Nomura S, Yoshikawa H, Hashimoto J, Hirota S, Kitamura Y, Oikawa S, Ono K & al. (1994) Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing. *J Bone Miner Res* 9: 651-659
113. Navasa M, Forns X, Sanchez V, Andreu H, Marcos V, Borrás JM, Rimola A, Grande L & al. (1996) Quality of life, major medical complications and hospital service utilization in patients with primary biliary cirrhosis after liver transplantation. *J Hepatol* 25: 129-134
114. Neff GW, Montalbano M & Tzakis AG (2003) Ten years of sirolimus therapy in orthotopic liver transplant recipients. *Transplant Proc* 35: 209S-216S
115. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S & Poltorak Z (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 13: 9-22
116. Nicosia RF (1998) What is the role of vascular endothelial growth factor-related molecules in tumor angiogenesis? *Am J Pathol* 153: 11-16
117. Nunamaker DM (1986) A new external skeletal fixation device that allows immediate full weightbearing: Application in the horse. *Vet Surg* 345-355
118. Nunamaker DM (1998) Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res* S56-65
119. Nunamaker DM & Perren SM (1979) A radiological and histological analysis of

- fracture healing using prebending of compression plates. *Clin Orthop Relat Res* 167-174
120. Nunamaker DM, Richardson DW & Butterweck DM (1991) Mechanical and biological effects of plate luting. *J Orthop Trauma* 5: 138-145
121. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM & Recker RR (1987) Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2: 595-610
122. Paydas S, Zorludemir S, Baslamisli F & Tuncer I (2002) Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in plasmacytoma. *Leuk Lymphoma* 43: 139-143
123. Perren SM, Huggler A, Russenberger M, Allgower M, Mathys R, Schenk R, Willenegger H & Muller ME (1969) The reaction of cortical bone to compression. *Acta Orthop Scand Suppl* 125: 19-29
124. Peter CP, Cook WO, Nunamaker DM, Provost MT, Seedor JG & Rodan GA (1996) Effect of alendronate on fracture healing and bone remodeling in dogs. *J Orthop Res* 14: 74-79
125. Petersen W, Wildemann B & Pufe T (2001) Das angiogenetische Peptid VEGF wird während der Frakturheilung exprimiert. *Z Orthop*
126. Pfitzmann R, Neuhaus P & Hetzer R (2001) Organtransplantation. Gruyter.
127. Phornphutkul C, Wu KY, Auyeung V, Chen Q & Gruppiso PA (2008) mTOR signaling contributes to chondrocyte differentiation. *Dev Dyn* 237: 702-712
128. Plate KH & Warnke PC (1997) Vascular endothelial growth factor. *J Neurooncol* 35: 365-372
129. Podbielski J & Schoenberg L (2001) Use of sirolimus in kidney transplantation. *Prog Transplant* 11: 29-32
130. Puech B, Cameli M, Chancrin JL, Pierre C, Dufour M & Elizagaray A (1990) Biointegration of massive bone allografts: imaging and histological studies in cat. *Biomaterials* 11: 75-78
131. Pufe T, Petersen W, Tillmann B & Mentlein R (2001) Splice variants VEGF121 and VEGF165 of the angiogenic peptide vascular endothelial cell growth factor are expressed in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 28: 1482-1485
132. Pufe T, Wildemann B, Petersen W, Mentlein R, Raschke M & Schmidmaier G (2002) Quantitative measurement of the splice variants 120 and 164 of the angiogenic peptide



- vascular endothelial growth factor in the time flow of fracture healing: a study in the rat. *Cell Tissue Res* 309: 387-392
133. Radasch RM (1999) Biomechanics of bone and fractures. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 29: 1045-82, v-vi
134. Restucci B, Papparella S, Maiolino P & De Vico G (2002) Expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumors. *Vet Pathol* 39: 488-493
135. Rhinelander FW (1974) Tibial blood supply in relation to fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 34-81
136. Richardson DW & Nunamaker DM (1991) Evaluation of plate luting, using an in vivo ovine osteotomy model. *Am J Vet Res* 52: 1468-1473
137. Rossant J & Nagy A (1995) Genome engineering: the new mouse genetics. *Nat Med* 1: 592-594
138. Roush JK & Wilson JW (1990) Effects of plate luting on cortical vascularity and development of cortical porosity in canine femurs. *Vet Surg* 19: 208-214
139. Rueter A, Trentz O & Wagner M (2003) *Unfallchirurgie*. Urban & Fischer Bei Elsevier.
140. Russell G, Tucci M, Conflitti J, Graves M, Wingerter S, Woodall JJ, Ragab A & Benghuzzi H (2007) Characterization of a femoral segmental nonunion model in laboratory rats: report of a novel surgical technique. *J Invest Surg* 20: 249-255
141. Saadeh PB, Mehrara BJ, Steinbrech DS, Dudziak ME, Greenwald JA, Luchs JS, Spector JA, Ueno H & al. (1999) Transforming growth factor-beta1 modulates the expression of vascular endothelial growth factor by osteoblasts. *Am J Physiol* 277: C628-37
142. Saadeh PB, Mehrara BJ, Steinbrech DS, Spector JA, Greenwald JA, Chin GS, Ueno H, Gittes GK & al. (2000) Mechanisms of fibroblast growth factor-2 modulation of vascular endothelial growth factor expression by osteoblastic cells. *Endocrinology* 141: 2075-2083
143. Saikali JA, Truong LD & Suki WN (2003) Sirolimus may promote thrombotic microangiopathy. *Am J Transplant* 3: 229-230
144. Santavirta S, Kontinen YT, Nordstrom D, Makela A, Sorsa T, Hukkanen M & Rokkanen P (1992) Immunologic studies of nonunited fractures. *Acta Orthop Scand* 63: 579-586
145. Schaffer M, Schier R, Napirei M, Michalski S, Traska T & Viebahn R (2007) Sirolimus impairs wound healing. *Langenbecks Arch Surg* 392: 297-303

146. Schemitsch EH, Kowalski MJ, Swiontkowski MF & Harrington RM (1995) Comparison of the effect of reamed and unreamed locked intramedullary nailing on blood flow in the callus and strength of union following fracture of the sheep tibia. *J Orthop Res* 13: 382-389
147. Schemitsch EH, Kowalski MJ, Swiontkowski MF & Senft D (1994) Cortical bone blood flow in reamed and unreamed locked intramedullary nailing: a fractured tibia model in sheep. *J Orthop Trauma* 8: 373-382
148. Schenk RK & Willenegger HR (1977) Histology of primary bone healing: modifications and limits of recovery of gaps in relation to extent of the defect (author's transl). *Unfallheilkunde* 80: 155-160
149. Schiebler TH & Schmidt W (2003). *Anatomie*. Springer, Berlin.
150. Schmidmaier G, Wildemann B, Meli B, Krummre G, Einhorn TA, Haas NP & Raschke M (2004) Development and Characterization of a Standard Closed Tibial Fracture Model in the Rat. *Eur J Trauma* 30: 35-42
151. Schoen M, Rotter R, Schattner S, Mittlmeier T, Claes L, Vollmar B & Gradl G (2008) Introduction of a new interlocked intramedullary nailing device for stabilization of critically sized femoral defects in the rat: A combined biomechanical and animal experimental study. *J Orthop Res* 26: 184-189
152. Schoppmann SF, Birner P, Stockl J, Kalt R, Ullrich R, Caucig C, Kriehuber E, Nagy K & al. (2002) Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am J Pathol* 161: 947-956
153. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS & Dvorak HF (1983) Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219: 983-985
154. Serkova N, Christians U, Flogel U, Pfeuffer J & Leibfritz D (1997) Assessment of the mechanism of astrocyte swelling induced by the macrolide immunosuppressant sirolimus using multinuclear nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chem Res Toxicol* 10: 1359-1363
155. Shimokado K, Raines EW, Madtes DK, Barrett TB, Benditt EP & Ross R (1985) A significant part of macrophage-derived growth factor consists of at least two forms of PDGF. *Cell* 43: 277-286
156. Sigal NH & Dumont FJ (1992) Cyclosporin A, FK-506, and rapamycin: pharmacologic probes of lymphocyte signal transduction. *Annu Rev Immunol* 10: 519-560

157. Singha UK, Jiang Y, Yu S, Luo M, Lu Y, Zhang J & Xiao G (2008) Rapamycin inhibits osteoblast proliferation and differentiation in MC3T3-E1 cells and primary mouse bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem* 103: 434-446
158. Stafford HJ, Roberts MT, Oni OO, Hay J & Gregg P (1994) Localisation of bone-forming cells during fracture healing by osteocalcin immunocytochemistry: an experimental study of the rabbit tibia. *J Orthop Res* 12: 29-39
159. Stallone G, Schena A, Infante B, Di Paolo S, Loverre A, Maggio G, Ranieri E, Gesualdo L & al. (2005) Sirolimus for Kaposi's sarcoma in renal-transplant recipients. *N Engl J Med* 352: 1317-1323
160. Steen H & Fjeld TO (1989) Lengthening osteotomy in the metaphysis and diaphysis. An experimental study in the ovine tibia. *Clin Orthop Relat Res* 297-305
161. Steen H, Fjeld TO, Bjerkreim I, Tevik A, Aldegheri R & Trivella G (1988) Limb lengthening by diaphyseal corticotomy, callus distraction, and dynamic axial fixation. An experimental study in the ovine femur. *J Orthop Res* 6: 730-735
162. Stempfle HU, Werner C, Siebert U, Assum T, Wehr U, Rambeck WA, Meiser B, Theisen K & al. (2002) The role of tacrolimus (FK506)-based immunosuppression on bone mineral density and bone turnover after cardiac transplantation: a prospective, longitudinal, randomized, double-blind trial with calcitriol. *Transplantation* 73: 547-552
163. Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FVJ, Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J & al. (2002) Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 9656-9661
164. Strong ML, Wong-Chung J, Babikian G & Brody A (1992) Rotational remodeling of malrotated femoral fractures: a model in the rabbit. *J Pediatr Orthop* 12: 173-176
165. Takahashi T, Shirasawa T, Miyake K, Yahagi Y, Maruyama N, Kasahara N, Kawamura T, Matsumura O & al. (1995) Protein tyrosine kinases expressed in glomeruli and cultured glomerular cells: Flt-1 and VEGF expression in renal mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 209: 218-226
166. Teitelbaum SL & Ross FP (2003) Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 4: 638-649
167. Terjesen T & Johnson E (1986) Effects of fixation stiffness on fracture healing. External fixation of tibial osteotomy in the rabbit. *Acta Orthop Scand* 57: 146-148
168. Tischer E, Gospodarowicz D, Mitchell R, Silva M, Schilling J, Lau K, Crisp T, Fiddes JC & al. (1989) Vascular endothelial growth factor: a new member of the platelet-

- derived growth factor gene family. *Biochem Biophys Res Commun* 165: 1198-1206
169. Toombs JP, Wallace LJ, Bjorling DE & Rowland GN (1985) Evaluation of Key's hypothesis in the feline tibia: an experimental model for augmented bone healing studies. *Am J Vet Res* 46: 513-518
170. Torry DS, Holt VJ, Keenan JA, Harris G, Caudle MR & Torry RJ (1996) Vascular endothelial growth factor expression in cycling human endometrium. *Fertil Steril* 66: 72-80
171. Tremain N, Korkko J, Ibberson D, Kopen GC, DiGirolamo C & Phinney DG (2001) MicroSAGE analysis of 2,353 expressed genes in a single cell-derived colony of undifferentiated human mesenchymal stem cells reveals mRNAs of multiple cell lineages. *Stem Cells* 19: 408-418
172. Trotter JF (2003) Sirolimus in liver transplantation. *Transplant Proc* 35: 193S-200S
173. Utvag SE, Grundnes O & Reikeras O (1994) Healing of segmental and simple fractures in rats. *Acta Orthop Scand* 65: 559-563
174. Vaisman N, Gospodarowicz D & Neufeld G (1990) Characterization of the receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 265: 19461-19466
175. Van Duyne GD, Standaert RF, Karplus PA, Schreiber SL & Clardy J (1993) Atomic structures of the human immunophilin FKBP-12 complexes with FK506 and rapamycin. *J Mol Biol* 229: 105-124
176. Voggenreiter G, Siozos P, Hunkemoller E, Heute S, Schwarz M & Obertacke U (2005) Immunosuppression with FK506 has no influence on fracture healing in the rat. *Bone* 37: 227-233
177. Volpon JB (1994) Nonunion using a canine model. *Arch Orthop Trauma Surg* 113: 312-317
178. Vossen M, Edelstein J, Majzoub RK, Maldonado C, Perez-Abadia G, Voor MJ, Orhun H, Tecimer T & al. (2005) Bone quality and healing in a swine vascularized bone allotransplantation model using cyclosporine-based immunosuppression therapy. *Plast Reconstr Surg* 115: 529-538
179. Warren SB, Pelker RR & Friedlaender GE (1985) Effects of short-term cyclosporin-A on biomechanical properties of intact and fractured bone in the rat. *J Orthop Res* 3: 96-100
180. Weindel K, Marme D & Weich HA (1992) AIDS-associated Kaposi's sarcoma cells in culture express vascular endothelial growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 183: 1167-1174

181. Wildemann B, Schmidmaier G, Ordel S, Stange R, Haas NP & Raschke M (2003) Cell proliferation and differentiation during fracture healing are influenced by locally applied IGF-I and TGF-beta1: comparison of two proliferation markers, PCNA and BrdU. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 65: 150-156
182. Willie B, Adkins K, Zheng X, Simon U & Claes L (2008) Mechanical characterization of external fixator stiffness for a rat femoral fracture model. *J Orthop Res*
183. Wingerter S, Calvert G, Tucci M, Tsao A, Russell G & Benghuzzi H (2007) Comparison of two different fixation techniques for a segmental defect in a rat femur model. *J Invest Surg* 20: 149-155
184. Yamagiwa H, Tokunaga K, Hayami T, Hatano H, Uchida M, Endo N & Takahashi HE (1999) Expression of metalloproteinase-13 (Collagenase-3) is induced during fracture healing in mice. *Bone* 25: 197-203
185. Yang R, Thomas GR, Bunting S, Ko A, Ferrara N, Keyt B, Ross J & Jin H (1996) Effects of vascular endothelial growth factor on hemodynamics and cardiac performance. *J Cardiovasc Pharmacol* 27: 838-844
186. Yang X & Cepko CL (1996) Flk-1, a receptor for vascular endothelial growth factor (VEGF), is expressed by retinal progenitor cells. *J Neurosci* 16: 6089-6099
187. Zachos TA, Bertone AL, Wassenaar PA & Weisbrode SE (2007) Rodent models for the study of articular fracture healing. *J Invest Surg* 20: 87-95
188. Zakliczynski M, Nozynski J, Kocher A, Lizak MK, Zakliczynska H, Przybylski R, Wojarski J & Zembala M (2007) Surgical wound-healing complications in heart transplant recipients treated with rapamycin. *Wound Repair Regen* 15: 316-321

## 7 Publikationen/Danksagung

### 7.1 Publikationen

Diese Arbeit wurde auf verschiedenen internationalen Kongressen vorgestellt und wie folgt publiziert:

6th Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies, Honolulu, Hawaii, USA, 2007:

Holstein JH, Klein M, Garcia P, Histing T, Laschke MW, Scheuer C, Meier C, Pohlemann T & Menger MD

Rapamycin affects early fracture healing in mice by inhibiting vascular endothelial growth factor (VEGF) expression during endochondral ossification

9th Congress of the European Federation of National Associations of Orthopaedics and Traumatology, Nice, France, 2008:

Holstein JH, Klein M, Garcia P, Histing T, Laschke MW, Scheuer C, Meier C, Pohlemann T & Menger MD

Rapamycin affects early fracture healing in mice by inhibiting vascular endothelial growth factor (VEGF) expression during endochondral ossification

Publikation:

Holstein JH, Klein M, Garcia P, Histing T, Culemann U, Pizanis A, Laschke MW, Scheuer C, Meier C, Schorr H, Pohlemann T & Menger MD (2008) Rapamycin affects early fracture healing in mice. Br J Pharmacol 154: 1055-1062

## 7.2 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen haben:

Meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Tim Pohlemann danke ich ganz besonders für die Überlassung des Themas und die ausgezeichneten Möglichkeiten, es zu bearbeiten.

Herrn Dr. med. Jörg H. Holstein, meinem Betreuer, danke ich für seine Freundschaft. Ohne seine Hilfe und Unterstützung wäre die Durchführung der Arbeit nicht möglich gewesen.

Herrn Professor Dr. med. Michael D. Menger danke ich für die Hilfe bei der Durchführung meiner Arbeit und für das großzügige Bereitstellen der Räumlichkeiten und Gerätschaften.

Frau Dr. rer. nat. C. Scheuer und Frau J. Becker möchte ich ganz besonders für die großartige Unterstützung in der Durchführung der proteinbiochemischen und histologischen Analysen danken.

Frau Dr. med. vet. Monika Frings danke ich für die große Unterstützung während der Tierversuche.

Herrn Prof. Dr. med. dent. Matthias Hannig und Herrn Dr. med. dent. Fuad Al Marrawi danke ich für die Ermöglichung der Röntgenanalysen.

Ferner möchte ich mich bei allen Kollegen aus dem Institut für klinisch-experimentelle Chirurgie für das freundliche Arbeitsklima und die erstklassige Zusammenarbeit bedanken.

Meinen Eltern danke ich für Ihre Liebe und Unterstützung.

## 8 Lebenslauf

### Personalien

Name:	Moritz Klein
Geburtsdatum:	20.08.1981
Geburtsort:	Zweibrücken
Familienstand:	Ledig
Eltern:	Dr. Horst Klein Ulrike Klein, geb. Faul
Schwester:	Laura Klein

### Schulausbildung

2000	Allgemeine Hochschulreife
1991-2000	Gymnasium Johanneum, Homburg/Saar

### Studium

2008	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2004	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2002-2008	Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
2001-2002	Studium der Wirtschaftsmathematik, Technische Universität, Kaiserslautern

### Praktika

2008	Praktisches Jahr, Urologie, Professor M. Stöckle, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
------	--



2007-2008	Praktisches Jahr, Innere Medizin IV, Professor D. Fliser und Innere Medizin III, Professor M. Böhm, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
2007	Praktisches Jahr, Thorax- und Herz-Gefäßchirurgie, Professor H.-J. Schäfers, Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie, Professor T. Pohlemann und Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie, Professor M. Schilling, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
2007	Famulatur, Unfallchirurgie, Dr. J. Mischo, Kreiskrankenhaus, St. Ingbert
2006	Famulatur, Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Professor M.-B. Bloching, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
2006	Famulatur, Chirurgische Praxis Dr. H. Klein, Homburg/Saar
2005	Famulatur, Viszeralchirurgie, Dr. M. Lindemann Kreiskrankenhaus, St. Ingbert

## **Wehrdienst**

2000-2001	Wehrrersatzdienst, Klinik für Nuklearmedizin, Professor C.-M. Kirsch, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
-----------	---